



**Joana Rita
Castanheira
Alexandre
Pinheiro da Silva**

**Estudo do gene *PROC* em indivíduos com
deficiência de proteína C**



**Joana Rita
Castanheira
Alexandre
Pinheiro da Silva**

**Estudo do gene *PROC* em indivíduos com
deficiência de proteína C**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria Letícia Sousa Ribeiro, Directora Clínica do Departamento de Hematologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, e sob a co-orientação da Professora Doutora Odete Abreu Beirão da Cruz e Silva, Professora Auxiliar com Agregação da Secção Autónoma de Ciências da Saúde da Universidade de Aveiro

Ao Jorge

o júri

presidente

Professora Doutora Maria de Lurdes Gomes Pereira

Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Odete A. B. da Cruz e Silva

Professora Auxiliar com Agregação da Secção Autónoma de Ciências da Saúde da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Sandra Maria Tavares da Costa Rebelo

Professora Auxiliar Convidada da Secção Autónoma de Ciências da Saúde da Universidade de Aveiro

Doutora Maria Letícia de Sousa Ribeiro

Directora do Departamento de Hematologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

agradecimentos

Em primeiro lugar, à Doutora Letícia Ribeiro, que me permitiu a realização da Dissertação no Departamento de Hematologia do Centro Hospitalar de Coimbra. Agradeço imenso as suas orientações e sugestões, sempre com um extraordinário rigor científico.

À Dr.^a Natália Martins, pela oportunidade de trabalhar na Unidade de Hemostase, na realização deste projecto; pela ajuda na obtenção de informação clínica; e pelo espírito crítico. Obrigada pela sua disponibilidade.

À Mestre Teresa Fidalgo, por todo o seu tempo e empenho. Pela orientação científica, ensinamentos, disponibilidade imensa, paciência e pela ajuda, de boa vontade, na elaboração desta Dissertação. Obrigada pelo seu compromisso incansável, força e exemplo de grande capacidade de trabalho.

À Professora Doutora Maria de Lurdes Pereira, pelo acompanhamento constante, sempre disponível para as minhas dúvidas, ao longo de todo este tempo.

À Professora Doutora Odete da Cruz e Silva, agradeço por ter aceite ser minha orientadora. Obrigada pela sua solicitude e compreensão, e por me ter acompanhado na elaboração deste trabalho.

Ao Professor Doutor Edgar da Cruz e Silva, *in memoriam*, pela oportunidade de o ter conhecido; pela sua disponibilidade, dedicação, e exemplo.

À Patricia Martinho, pela orientação no Laboratório de Hemostase Molecular; pela ajuda na organização dos dados, pelo *brainstorming*, e pelo contributo imprescindível na realização deste trabalho.

Ao Dr. Ramón Salvado e a todas as colegas da Unidade de Hemostase, pela ajuda na selecção dos indivíduos e recolha de amostras; e pela colaboração constante.

À Denise, à Rita, à Magda e à Liliana, pela motivação incansável.

Aos meus pais e irmãos, pelo incentivo e pela compreensão nas muitas ausências.

E por fim, ao Jorge, por todo o seu tempo, por estar disponível a qualquer hora. Obrigada por toda a tua força e amor, essenciais para acreditar, continuar e acabar esta Dissertação.

palavras-chave

Trombose venosa; factores de risco trombótico; proteína C; deficiência de proteína C; gene *PROC*; estudos familiares

resumo

A proteína C (PC) é um dos inibidores fisiológicos mais importantes da coagulação sanguínea. A natureza multifactorial da trombose venosa, além dos factores de risco adquiridos, tem uma forte componente hereditária. A deficiência congénita de PC induz um estado de hipercoagulabilidade, que a torna num dos principais factores de risco de tromboembolismo venoso. Embora rara, a ocorrência de manifestações trombóticas severas no período neonatal, associados a homozigotia ou heterozigotia composta, demonstra a importância da actividade anticoagulante da PC. Os níveis plasmáticos de PC nem sempre são esclarecedores, uma vez que há indivíduos com deficiência que apresentam um intervalo de valores sobreponíveis aos dos indivíduos normais. Nestes casos, apenas pelo estudo molecular do gene da PC (*PROC*) é possível confirmar a deficiência. Nesta dissertação, foi efectuado o estudo do gene *PROC*, num grupo de indivíduos pertencentes a famílias com défice de PC e com história clínica e/ou familiar de tromboembolismo venoso. Como objectivo principal, pretendeu-se efectuar uma correlação genótipo/fenótipo em famílias com história de trombose venosa e níveis plasmáticos de PC persistentemente baixos (ou próximo do valor de limite da normalidade). Para tal, relacionaram-se as mutações encontradas no gene *PROC* e os haplótipos CGT e TAA em homozigotia dos polimorfismos da região promotora -1654C>T, -1641A>G, -1479A>T, com os níveis plasmáticos de PC. Foram encontradas sete mutações diferentes, previamente descritas: -13A>G; g.595 C>T; g.633_634delGC; g.629C>T; g.659G>A; g.715G>A; g.1015G>A. O estudo molecular confirmou défices em caso de suspeita e, consoante o tipo e localização da mutação permitiu inferir o fenótipo. A identificação de mutações no gene *PROC* não revelou valor prognóstico. No entanto, se for efectuada no âmbito de estudos familiares, pode ser útil para decidir profilaxia em situações de risco, e ainda possibilita o diagnóstico pré-natal nos casos mais severos. O estudo molecular de alterações no gene *PROC*, e o seu efeito, é também muito importante na medida em que contribui para o esclarecimento da estrutura e funções da PC. Futuramente, pretender-se-ia melhorar o conhecimento da função da PC, quando diminuída, como factor de risco para trombose, e tornar a identificação de portadores de mutações no gene *PROC*, um estudo complementar de rotina nos laboratórios de diagnóstico.

keywords

Venous thrombosis; thrombotic risk factors; protein C; deficiency of protein C; *PROC* gene; familiar studies

abstract

Protein C (PC) is one of the most important physiological inhibitors of blood coagulation. The multifactorial nature of venous thrombosis counts with a strong hereditary predisposition, besides the acquired risk factors. The congenital PC deficiency leads to a state of hypercoagulability, and that's why it is considered one of the most important venous thrombosis risk factors. Although, this situation is rare, the occurrence of severe thromboembolic episodes associated with homozygotes and compound heterozygotes individuals, during the neonatal period, illustrates the importance of the anticoagulant property of PC. The PC plasma levels not always are helpful, because the levels of a PC deficient individual may overlap with those of normal ones. In these cases, only the molecular study of the PC gene (*PROC*) can confirm the deficiency. It was studied the *PROC* gene of a group of individuals from PC deficient families and with personal and/or family venous thrombosis history. The main objective of this dissertation consists in genotype/phenotype correlation within families with history of venous thrombosis and repeated low plasma levels of PC (or with borderline values). For this purpose, it was evaluated the relationship between the mutations found in *PROC* gene and CGT and TAA homozygous haplotypes, of -1654C>T, -1641A>G, -1479A>T promoter polymorphisms, and plasma levels of PC. It was identified seven different mutations, previously described: -13A>G; g.595 C>T; g.633_634delGC; g.629C>T; g.659G>A; g.715G>A; g.1015G>A. The molecular study confirmed those doubtful cases, and allowed the deduction of phenotype, according to the type and local of mutations. The identification of *PROC* gene mutations didn't show prognostic value. However, in family studies context, it can be useful to implement prophylaxis, and to offer the prenatal diagnosis, in severe cases. The study of *PROC* gene and the effect of mutations also contributes for the knowledge of structure and function of PC. Hereafter, it would be important to set up a routine molecular study in diagnostic laboratories, hoping it would improve the understanding of PC function in coagulation mechanisms and thrombotic tendency.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABELAS	IV
ABREVIATURAS	V
I - INTRODUÇÃO	1
1. HEMOSTASE	3
2. TROMBOFILIA	5
3. SISTEMA DA PROTEÍNA C	6
3.1. ACTIVIDADE ANTICOAGULANTE DA PROTEÍNA C	7
3.2. INIBIÇÃO DA PROTEÍNA C ACTIVADA	8
3.3. ESTRUTURA DO GENE <i>PROC</i> E ESTRUTURA PRIMÁRIA DA PROTEÍNA C	8
3.4. DEFICIÊNCIA CONGÉNITA DE PROTEÍNA C	11
4. OBJECTIVOS DO ESTUDO	13
5. QUESTÕES ÉTICAS	14
6. A IMPORTÂNCIA DO ESTUDO	14
II – MATERIAL E MÉTODOS	15
1. POPULAÇÃO DE ESTUDO	17
2. COLHEITA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	17
2.1. MÉTODO DE SELEÇÃO DAS AMOSTRAS	18
3. METODOLOGIAS	18
3.1. DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE DA PROTEÍNA C POR SUBSTRATO CROMOGÉNICO	18
3.2. DOSEAMENTO DA PROTEÍNA C ANTIGÉNICA POR IMUNOENSAIO	19
3.3. ESTUDO MOLECULAR DO GENE <i>PROC</i>	20
3.3.1. EXTRACÇÃO DE DNA	20
3.3.2. AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>PROC</i> POR REACÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA (PCR) CONVENCIONAL	20
3.3.3. ELECTROFORESE DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO	23
3.3.4. SEQUENCIAÇÃO DO GENE <i>PROC</i>	23
3.3.4.1. PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR POR MÉTODO ENZIMÁTICO	23
3.3.4.2. SEQUENCIAÇÃO NUCLEOTÍDICA DIRECTA DOS PRODUTOS DE PCR PURIFICADOS	24
3.3.4.3. PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE SEQUENCIAÇÃO	24
3.3.4.4. ELECTROFORESE CAPILAR EM SEQUENCIADOR AUTOMÁTICO	25
3.3.4.5. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DO GENE <i>PROC</i>	26
3.3.4.6. MODULAÇÃO MOLECULAR	27
3.3.4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS HAPLÓTIPOS GGT E TAA EM HOMOZIGOTIA DOS POLIMORFISMOS -1654 C>T, -1641 A>G E -1479 A>T DO PROMOTOR DO GENE <i>PROC</i> NA POPULAÇÃO-CONTROLO	28
II – RESULTADOS E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	29
ESTUDOS MOLECULARES DO GENE <i>PROC</i> EM FAMÍLIAS COM DÉFICE DE PC	31
1. PREVALÊNCIA DOS POLIMORFISMOS -1654C>T, -1641A>G E -1479A>T DO PROMOTOR DO GENE <i>PROC</i>	33
2. CARACTERIZAÇÃO DAS MUTAÇÕES NO GENE <i>PROC</i>	35
2.1. MUTAÇÃO REGULADORA NO PROMOTOR: -13 A>G	35

2.3. MUTAÇÃO <i>NONSENSE</i> - P.R199X	36
2.2. PEQUENA DELEÇÃO - P.L212HFS*2.....	39
2.4. MUTAÇÕES <i>MISSENSE</i> – P.P210L; P.R220Q; G239R; V339M	40
2.4.1. MODELAÇÃO MOLECULAR E RELAÇÃO FENOTÍPICA	41
2.4.1.1. P.P210L.....	41
2.4.1.2. P.R220Q.....	43
2.4.1.3. P.G239R.....	45
2.4.1.4. P.V339M	48
IV – CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	51
CONCLUSÃO	53
PERSPECTIVAS FUTURAS	55
V- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

Errata

Dissertação de Mestrado em Biologia Molecular e Celular - 2012

Estudo do gene PROC em indivíduos com deficiência de proteína C

(A errata é válida para suporte de papel e digital, em “pdf”).

A numeração das referências bibliográficas que constam nas figuras, apenas a partir da Figura 2, e as das tabelas está incorrecta: é necessário acrescentar uma unidade a cada uma.

Portanto,

- na página 8, Figura 2, onde aparece “(22)” deveria estar “(23)”;
 - na página 9, Figura 3, onde aparece “(37)” deveria estar “(38)”;
 - onde aparece “(38)” deveria estar “(39)”;
 - onde aparece “(30)” deveria estar “(31)”;
 - na página 11, Figura 4, onde aparece “(38)” deveria estar “(39)”;
 - onde aparece “(44)” deveria estar “(45)”;
 - onde aparece “(45)” deveria estar “(46)”;
 - na página 19, Figura 5, onde aparece “(66)” deveria estar “(67)”;
 - na página 20, Tabela 2, onde aparece “(66)” deveria estar “(67)”;
 - onde aparece “(67)” deveria estar “(68)”;
 - na página 21, Tabela 3, onde aparece “(69)” deveria estar “(70)”;
 - onde aparece “(70)” deveria estar “(71)”;
 - na página 32, Tabela 10, onde aparece “(38)” deveria estar “(39)”;
 - onde aparece “(37)” deveria estar “(38)”;
 - na página 37, Figura 9, onde aparece “(37)” deveria estar “(38)”;
 - onde aparece “(38)” deveria estar “(39)”;
 - na página 42, Tabela 14, onde aparece “(38)” deveria estar “(39)”;
 - onde aparece “(37)” deveria estar “(38)”;
 - na página 45, Figura 10, onde aparece “(55)” deveria estar “(56)”;
 - na página 46, Tabela 15, onde aparece “(74)” deveria estar “(75)”;
 - onde aparece “(75)” deveria estar “(76)”;
 - onde aparece “(55)” deveria estar “(56)”;
 - onde aparece “(38)” deveria estar “(39)”;
 - onde aparece “(37)” deveria estar “(38)”;
 - na página 47, Figura 11, onde aparece “(55)” deveria estar “(56)”;
 - na página 49, Figura 12, onde aparece “(55)” deveria estar “(56)”.
-

Índice de Figuras

FIGURA 1. GERAÇÃO DE TROMBINA: (À ESQUERDA) ACTIVAÇÃO DA COAGULAÇÃO NAS CÉLULAS ENDOTELIAIS, E (À DIREITA) AMPLIFICAÇÃO NAS PLAQUETAS ACTIVADAS. TF-FACTOR TECIDULAR; T-TROMBINA; PT-PROTROMBINA; VWF-FACTOR VON WILLEBRAND. (ADAPTADO DE DAHLBACK B, 2008 (2))	5
FIGURA 2. (À ESQUERDA) ACTIVAÇÃO DA PC PELO COMPLEXO TM-TROMBINA (FIIA)-EPCR; (À DIREITA) ACTIVIDADE ANTICOGULANTE DA PC: INACTIVAÇÃO DOS FVA E FVIII, NA PRESENÇA DE CÁLCIO, IMPEDINDO A FORMAÇÃO DOS COMPLEXOS <i>PROTROMBINASE</i> E <i>TENASE</i> , RESPECTIVAMENTE. (ADAPTADO DE GERRY AFN, 2011 (22))	8
FIGURA 3. REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA EXÓNICA E INTRÓNICA DO GENE <i>PROC</i> , E DOS DOMÍNIOS CORRESPONDENTES À PC PRECURSORA. (NUMERAÇÃO DE FOSTER D ET AL (1984) (37) A AZUL; NUMERAÇÃO HGVS (38), A NEGRO. (ADAPTADO DE PAVLOVA A, 2003 (30))	9
FIGURA 4. (À ESQUERDA) ZIMOGÉNIO DA PC E SUA ACTIVAÇÃO PELA CLIVAGEM DO COMPLEXO T/TM, NA ARG211; (À DIREITA) REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DA APC. NUMERAÇÃO DA HGVS (38). (ADAPTADO DE WACEY AI, 1993 (44); E HTTP://WWW1.IMPERIAL.AC.UK/MEDICINE/ABOUT/DIVISIONS/IS/HAEMO/COAG/ (45))	11
FIGURA 5. REPRESENTAÇÃO DAS REACÇÕES NA DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DA ACTIVIDADE DE PC, POR UM ENSAIO CROMOGÉNICO. (ADOPTADO DA BULA DO KIT DE DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE DE PC <i>HEMOSIL™</i> <i>PROTEIN C</i> – IL) (66)	19
FIGURA 6. PADRÃO ELECTROFORÉTICO DOS EXÕES E REGIÕES FLAQUEANTES DO GENE <i>PROC</i> (OS EXÕES ESTÃO IDENTIFICADOS COMO PC1,ETC).....	23
FIGURA 7. EXEMPLO DE ELECTROFEROGRAMA DO PROGRAMA <i>SEQSCAPE®</i> : MUTAÇÃO EM HETEROZIGOTIA NO EXÃO 7 DO GENE <i>PROC</i>	26
FIGURA 8. <i>FLOW CHART</i> DO ESTUDO DAS FAMÍLIAS COM DEFICIÊNCIA DE PC.	31
FIGURA 9. REPRESENTAÇÃO DOS ELECTROFEROGRAMAS (<i>SEPSCAPE®</i>) DAS MUTAÇÕES IDENTIFICADAS NO GENE <i>PROC</i> , E DOS GENÓTIPOS CC/AG/AT, CC/GG/TT E TT/AA/AA CORRESPONDENTES AOS POLIMORFISMOS -1654C>T, -1641A>G E -1479A>T DO PROMOTOR. <i>HMZ</i> – HOMOZIGOTIA. A NOMENCLATURA USADA É SUGERIDA PELA HGVS (38).	37
FIGURA 10. R220Q: (À ESQUERDA) ESTRUTURA DA CADEIA PESADA DA PC COM O AMINOÁCIDO NATIVO ARGININA (R) NA POSIÇÃO 220; (À DIREITA) POSIÇÃO 220 COM O AMINOÁCIDO GLUTAMINA (Q). A SETA AZUL INDICA O LOCAL DA SUBSTITUIÇÃO. (ADAPTADO DE HTTP://WWW.ITB.CNR.IT/PROCMD/INDEX.HTML (55))	45
FIGURA 11. G239R: (À ESQUERDA) ESTRUTURA DA CADEIA PESADA DA PROTEÍNA C COMO O AMINOÁCIDO NATIVO GLICINA (G) NA POSIÇÃO 239; (À DIREITA) POSIÇÃO 239 COM O AMINOÁCIDO ARGININA (R). A SETA ROSA INDICA O LOCAL DA SUBSTITUIÇÃO. (ADAPTADO DE HTTP://WWW.ITB.CNR.IT/PROCMD/INDEX.HTML (55))	47
FIGURA 12. V339M: (À ESQUERDA) ESTRUTURA DA CADEIA PESADA DA PC COMO O AMINOÁCIDO NATIVO VALINA(V) NA POSIÇÃO 339; (À DIREITA) POSIÇÃO 339 COM O AMINOÁCIDO METIONINA (M). A SETA ROSA INDICA O LOCAL DA SUBSTITUIÇÃO. (ADAPTADO DE HTTP://WWW.ITB.CNR.IT/PROCMD/INDEX.HTML (55))	49

Índice de Tabelas

TABELA 1. DADOS CLÍNICOS DOS <i>PROPOSITA</i>	18
TABELA 2. VALORES REFERÊNCIA NORMAIS DOS NÍVEIS DE PC.	20
TABELA 3. CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>PROC</i>	21
TABELA 4. KITS DE <i>PRIMERS</i> PARA EXÕES 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9 NUM VOLUME TOTAL DE 70 µL.....	21
TABELA 5. PROTOCOLO DA <i>MASTER-MIX</i> DOS EXÕES 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9 E REGIÕES INTRÓNICAS FLAQUEANTES CORRESPONDENTES.	22
TABELA 6. PROTOCOLO DA <i>MASTER-MIX</i> DOS EXÕES 4+5 E REGIÕES INTRÓNICAS FLAQUEANTES CORRESPONDENTES.	22
TABELA 7. PROTOCOLO DE AMPLIFICAÇÃO POR PCR CONVENCIONAL DO GENE <i>PROC</i> OPTIMIZADO NO LABORATÓRIO	22
TABELA 8. PROTOCOLO DE SEQUENCIAÇÃO DOS EXÕES E ZONAS FLANQUEANTES DO GENE <i>PROC</i>	24
TABELA 9. COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DE ACTIVIDADE DE PC DOS INDIVÍDUOS-CONTROLO, QUE APRESENTAM CGT E TAA EM HOMOZIGOTIA.	28
TABELA 10. OS INDIVÍDUOS COM MUTAÇÃO NO GENE <i>PROC</i> : NÍVEIS DE PC, GENÓTIPO DE POLIMORFISMOS NO PROMOTOR E DE GENES MODULADORES.....	32
TABELA 11. FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DOS POLIMORFISMOS -1654 C>T, -1641A>G, -1479 A>T DO PROMOTOR DO GENE <i>PROC</i> (POPULAÇÃO ESTUDADA RELATIVAMENTE À POPULAÇÃO-CONTROLO (83)).	33
TABELA 12. DISTRIBUIÇÃO DA FREQUÊNCIA DOS GENÓTIPOS DOS POLIMORFISMOS NO PROMOTOR DO GENE <i>PROC</i> E RESPECTIVAS MÉDIAS DE ANTIGÉNIO E ACTIVIDADE DE PC NA POPULAÇÃO ESTUDADA.	34
TABELA 13. HAPLÓTIPOS CGT E TAA EM HOMOZIGOTIA EM INDIVÍDUOS COM DETERMINADAS MUTAÇÕES.	35
TABELA 14. RELAÇÃO ENTRE AS MUTAÇÕES IDENTIFICADAS NO GENE <i>PROC</i> E AS MANIFESTAÇÕES FENOTÍPICAS.	42
TABELA 15. MUTAÇÕES <i>MISSENSE</i> – CLASSIFICAÇÃO PELOS PROGRAMAS PREDITIVOS <i>POLYPHEN</i> E <i>SIFT</i>	46

Abreviaturas

A	Adenina
APC	<i>Activated protein C</i> (proteína C activada)
aa	Aminoácidos
Arg/R	Arginina
Asn/N	Asparagina
Asp/D	Ácido aspártico
AT	Antitrombina
ATG	Codão de iniciação
C	Citosina
cDNA	<i>Complementary Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucléico complementar)
ddNTPs	<i>Dideoxynucleotide Triphosphates</i> (dideoxinucleótidos trifosfato)
del	Delecção
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucléico)
dNTPs	<i>Deoxynucleotide Triphosphates</i> (deoxinucleótidos trifosfato)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DVK	Dependente de vitamina K
EGF-like	<i>Endothelial grow factor – like</i> (factor de crescimento endotelial – like)
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i>
EPCR	<i>Endothelial protein C receptor</i> (receptor endotelial da proteína C)
F	Factor
Fa	Factor activado
fs	<i>Frameshift</i>
FVL	Factor V de <i>Leiden</i>
FT	<i>Tissue factor</i> (factor tecidual)
G	Guanina
Gene <i>PROC</i>	Gene da proteína C
Gla	Ácido gama-carboxiglutâmico
Gln/Q	Glutamina
Glu/E	Ácido glutâmico
Gly/G	Glicina
HGMD	<i>Human Genetic Mutation Database</i>
HGVS	<i>Human Genome Variation Society</i>
His/H	Histidina
HNF	<i>Hepatic nuclear factor</i>
K₃EDTA	<i>Tripotassium Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (ácido etilenodiamino tetra-acético tripotássico)
Leu/L	Leucina
Lys/K	Lisina

Met/M	Metionina
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MLPA	<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
mQH₂O	Água Milli-Q (<i>Millipore Corporation</i>)
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MTHFR	Metilenotetrahidrofolato-reductase
nt	Nucleótido
pb	Pares de bases
PC	Proteína C
PCI	<i>Protein C inhibitor</i> (inibidor da proteína C)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (reacção polimerase em cadeia)
Polyphen	<i>Polymorphism Phenotyping</i>
Pro/P	Prolina
PROcMD	<i>3D Protein C Mutations Database</i>
PRT G20210A	Mutação G20210A no gene da protrombina
PS	Proteína S
PSI-BLAST	<i>Position-Specific Iterative- Basic Local Alignment Search Tool</i>
PSIC	<i>Position-Specific Independent Counts</i>
PT	Protrombina
q	Braço longo de um cromossoma
r	Repetição
Ser/S	Serina
SIFT	<i>Sorting Intolerant From Tolerant</i>
SP	Serina-protease
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
T	Timina
t-PA	<i>Tissue-plasminogen activator</i> (activador tecidular do plasminogénio)
TBE	Tampão Tris/Borato/EDTA
T/TM	Trombina/trombomodulina
TEP	Tromboembolismo pulmonar
TF	Tromboflebite
TM	Trombomodulina
TMB	tetrametilbenzidina
TVP	Trombose venosa profunda
UTR	<i>Untranslated region</i> (região não traduzida)
Val/V	Valina
VEGA	<i>Vertebrate Genome Annotation</i>
vWF	Factor <i>von</i> Willebrand
X	Codão de terminação

I - Introdução

Introdução

1. Hemostase

A coagulação sanguínea é um mecanismo de defesa do indivíduo que protege a integridade do sistema circulatório prevenindo perdas sanguíneas aquando de uma lesão vascular.

O equilíbrio do sistema hemostático depende da integridade da parede dos vasos sanguíneos, do número e função das plaquetas e dos factores plasmáticos da coagulação. A resposta do mecanismo de coagulação é geralmente limitada ao local da lesão e é proporcional, em magnitude, à extensão dos danos vasculares. A hemostase pode ser dividida em três fases: hemostase primária, secundária e terciária.

Aquando da lesão de um vaso sanguíneo, a parede vascular, expõe o factor tecidual (FT), que conjuntamente com as plaquetas circulantes que aderem ao local, conduz à formação imediata de um “tampão” no local da lesão (hemostase primária).

A activação dos vários factores de coagulação culmina com a geração de trombina, num processo de amplificação, convertendo uma proteína plasmática solúvel (fibrinogénio) numa proteína insolúvel (fibrina), que necessita ser estabilizada pelo Factor XIII (FXIII) para formar um coágulo estável (hemostase secundária). A integridade celular é restabelecida com a remoção e dissolução do coágulo (fibrinólise) pela plasmina. (1)

Estas propriedades da resposta do mecanismo hemostático requerem que as reacções que a constituem funcionem de forma localizada, amplificada e controlada – requisitos mantidos a nível celular em três etapas sobreponíveis: iniciação, amplificação e propagação. Estes mecanismos ocorrem na superfície de diferentes tipo de células, como plaquetas e células que expressem FT (fibroblastos, monócitos, eritrócitos), restos celulares e microvesículas que derivam de células activadas.

O complexo FT/FVII activado (FT/FVIIa) é o mais potente activador da coagulação. Em condições normais, uma pequena quantidade de FVIIa circula no plasma (~1% do total de FVII em circulação). A fase de iniciação ocorre com a exposição de FT que vai formar um complexo catalítico com o FVIIa (complexo FT/FVIIa) numa superfície fosfolipídica, activando pequenas quantidades de FX e FIX. O FXa com o seu cofactor, FVa, forma os complexos *protrombinase* na superfície das células que expressam FT. Na fase de amplificação, a trombina gerada vai activar plaquetas, que, por sua vez, expõem locais de ligação à sua superfície para factores da coagulação activados, os cofactores FV e FVIII e o FXI, de forma a preparar a produção de uma grande quantidade de trombina.

Durante a fase de propagação, que ocorre na superfície das plaquetas activadas, é formado mais FIXa, via FXIa ligado às plaquetas. O FIXa associa-se ao FVIIIa na presença de cálcio, formando o complexo *tenase*. Este complexo vai concentrar FX na superfície da plaqueta, que é rapidamente activado. O FXa associa-se com o FVa ligado à plaqueta durante a fase de amplificação. A formação do complexo *protrombinase* produz um aumento de geração de trombina com magnitude suficiente para produzir fibrina. O polímero de fibrina é estabilizado pelo FXIII, tornado insolúvel a rede de fibrina (Figura 1).

A interacção entre os factores de coagulação depende basicamente de uma superfície fosfolipídica. A co-localização destes componentes tem um efeito dramático no processo de coagulação acelerando a taxa de activação do FX e a formação de trombina.

Para evitar que a formação de fibrina se propague, a coagulação é controlada por um excesso de inibidores circulantes. Os mecanismos que regulam a formação do trombo incluem a fibrinólise, que actua limitando o crescimento do coágulo; e o sistema de anticoagulação natural. (2)

A anticoagulação natural ocorre por inibição enzimática ou por proteólise. Um exemplo da primeira é acção da antitrombina, uma proteína inibidora de serina-proteases, ou seja, uma serpina (*serpin* – *serin-protesase inhibitor*) que inibe enzimas livres, entre elas a trombina, FIXa e FXa. (3)

Por outro lado, o sistema da proteína C (PC) actua por proteólise, inactivando os cofactores procoagulantes FVIIIa e FVa, e impedindo a formação dos complexos *tenase* e *protrombinase*, respectivamente.

A principal característica do sistema anticoagulante da PC reside na capacidade de resposta ao aumento da concentração de trombina, tornando-se, deste modo, no mecanismo de defesa mais efectivo contra a ocorrência de episódios trombóticos. (4)

O último sistema de controlo de fibrina formada é o sistema fibrinolítico que mantém o sistema vascular desobstruído. O processo de degradação proteolítica da fibrina é iniciado com a activação da proenzima plasminogénio em plasmina, pelos activadores da parede do vaso sanguíneo (activação intrínseca) ou dos tecidos (activação extrínseca). A activação intrínseca da fibrinólise envolve os factores XII, XI, quinínogénio de alto peso molecular e pré-caliceína e, é menos relevante em comparação com a activação da fibrinólise pela via extrínseca, que envolve a libertação do activador tecidular do plasminogénio (t-PA) pelas células endoteliais. O t-PA liga-se à fibrina e potencia a conversão do plasminogénio em plasmina. Esta dependência de fibrina pelo t-PA localiza a geração de plasmina ao coágulo de fibrina. A regulação e o controlo do sistema fibrinolítico são conseguidos através dos activadores e inibidores envolvidos no processo. (5, 6)

A coagulação, anticoagulação e fibrinólise constituem um delicado equilíbrio fisiológico.

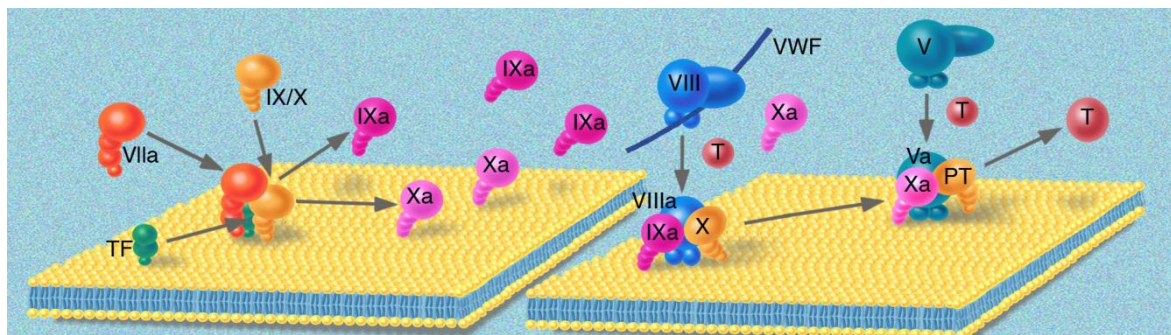


Figura 1. Geração de trombina: (à esquerda) activação da coagulação nas células endoteliais, e (à direita) amplificação nas plaquetas activadas. TF-factor tecidual; T-trombina; PT-protrombina; vWF-factor von Willebrand. (adaptado de Dahlback B, 2008 (2))

2. Trombofilia

A trombofilia é uma entidade de etiologia multifactorial sendo definida como a predisposição à trombose venosa, ou, ocasionalmente, arterial, devido a alterações hematológicas indutoras de hipercoagulabilidade sanguínea, resultado da interacção entre factores genéticos e adquiridos.

A trombose venosa tem uma incidência anual de 1 a 3 em cada 1000 habitantes, que aumenta com a idade, sendo extremamente rara em crianças. Ocorre em ambos os sexos com a mesma frequência, embora possa ser mais prevalente em mulheres em idade jovem.(7)

As manifestações clínicas mais comuns incluem a trombose venosa profunda (TVP) e o tromboembolismo pulmonar (TEP), tornando-a num dos principais problemas de saúde do mundo ocidental, dadas as elevadas taxas de morbilidade e mortalidade.

São factores de risco adquiridos a idade, a imobilização prolongada, cirurgias extensas, o trauma, a gravidez e puerpério, o uso de terapêutica anticoncepcional oral e terapêutica hormonal de substituição, estados inflamatórios e infecções, neoplasias, síndrome antifosfolipídico, e ainda diabetes, sedentarismo, hipertensão arterial, tabagismo, obesidade. (8)

Nas últimas décadas foram identificados diversos factores de risco genéticos associados a trombose. Estes factores afectam, na sua maioria, os mecanismos naturais de anticoagulação, resultando na perda do equilíbrio entre os sistemas pró e anticoagulante, a favor dos factores procoagulantes, e consequentemente num estado de hipercoagulabilidade.

A tendência hereditária para a trombose venosa deu origem ao termo trombofilia, e foi descrita pela primeira vez no início do século XX. Egeberg O (1965) descreveu a primeira família à qual foi identificada tendência hereditária para trombose venosa, causada pela deficiência de antitrombina. Na década de 80, Griffin JH *et al* e Schwarz HP *et al* reconheceram, pela primeira vez, a deficiência de PC e de proteína S (PS), respectivamente, como possíveis causas de trombofilia. (9-11)

Além da deficiência das principais proteínas anticoagulantes naturais (antitrombina, PC e PS), o polimorfismo FV *Leiden* (FVL) e o polimorfismo no promotor do gene da protrombina PRT G20210A encontram-se entre as alterações mais comuns, em caucasianos, que aumentam o risco trombótico. (12-14)

É neste contexto, da existência de inúmeros factores predisponentes, adquiridos e/ou genéticos, que a trombose venosa assume o carácter de doença multigénica e multifactorial. O efeito cumulativo ou sinérgico de múltiplos genes, cada um deles com um efeito variável, depende de factores circunstanciais, e é isto que, teoricamente, determina o grau de predisposição a trombose em cada indivíduo. (15)

Os estudos de trombofilia incluem a pesquisa de défices de factores anticoagulantes, fibrinolíticos e o aumento de alguns factores procoagulantes. Os algoritmos de estudo iniciam-se sempre pelos défices mais prevalentes e, na população europeia são: deficiência de PC, PS e antitrombina. Os estudos funcionais incluem a determinação da actividade e/ou antígeno da PC; actividade da PS livre e PS total; actividade da antitrombina e resistência à PC activada. Os estudos moleculares incluem a pesquisa do FVL e da variante da protrombina PRT G20210A. Têm sido também relacionadas com o aumento do risco de trombose os níveis elevados dos factores VIII, IX, factor de *von Willebrand* (FvW) e os grupos sanguíneos não-0. (16, 17)

A maioria dos factores de risco hereditários conhecidos para trombose são disfunções no sistema da PC. (18)

Nesta dissertação, é abordada a deficiência congénita de PC.

3. Sistema da proteína C

O sistema da PC é composto por diversas proteínas que actuam *on demand*, ou seja, é capaz de amplificar a resposta anticoagulante à medida que aumentam os mecanismos procoagulantes. Anomalias de uma ou várias estruturas deste sistema poderão predispor a um estado protrombótico. Por outro lado, o sistema da PC exerce funções pró-fibrinolíticas, e citoprotectoras (actividade anti-inflamatória e anti-apoptótica). (19)

A PC é uma glicoproteína dependente da vitamina K (DVK) com actividade serina-protease (SP), que circula no plasma na forma de zimogénio. É produzida, essencialmente, nos hepatócitos, embora as células endoteliais também a sintetizem. (20)

3.1. Actividade anticoagulante da proteína C

À medida que aumenta a concentração de trombina, ao longo do processo hemostático, esta liga-se ao seu receptor endotelial, a trombomodulina (TM), uma proteína transmembranar. Esta ligação, ao promover uma nova conformação da trombina, incapacita-a de exercer a sua actividade procoagulante.

Por sua vez, a PC converte-se num substrato de grande afinidade para o complexo trombina-trombomodulina (T/TM), o que induz a sua activação. Na superfície endotelial, a PC liga-se, ainda, ao seu receptor, o receptor endotelial da proteína C (EPCR), que potencia este processo de activação, cerca de 20 vezes. Por fim, a PC activada (APC) para exercer a sua actividade anticoagulante, desassocia-se do EPCR. (Figura 2)

A PS é uma glicoproteína DVK, sem actividade enzimática, que na sua forma livre exerce a função de cofactor da APC. O complexo APC/PS une-se à superfície plaquetar, onde têm lugar as reacções procoagulantes, e potencia a inactivação dos cofactores FVIIIa e FVa, impedindo, deste modo, a formação de trombina (Figura 2). (21)

Foram identificados no FVa os três resíduos de arginina (Arg), Arg306, Arg506 e Arg679, onde a APC cliva, com o objectivo da sua proteólise. (22) Dahlbäck B *et al* (1993) descreveram a substituição da Arg506 por um resíduo de Glu. Esta alteração, Arg506Glu, designada por FV *Leiden* (FVL), impede a inactivação do FVa, conferindo, assim, resistência à APC. O FVL constitui o factor de risco independente mais comum, em caucasianos, predisponente a trombose venosa. (23, 24)

O FV, na sua forma inactiva, desempenha funções anticoagulantes. Juntamente com a PS é imprescindível como cofactor da APC, tanto na inactivação do próprio FVa, como na do FVIIIa. (25, 26)

A APC proteolisa o FVIIIa em dois locais da sua estrutura homólogos ao FVa: Arg336 e Arg562. O FV, como cofactor da inactivação do FVIIIa, sofre, igualmente, clivagem ao nível da Arg506. (27)

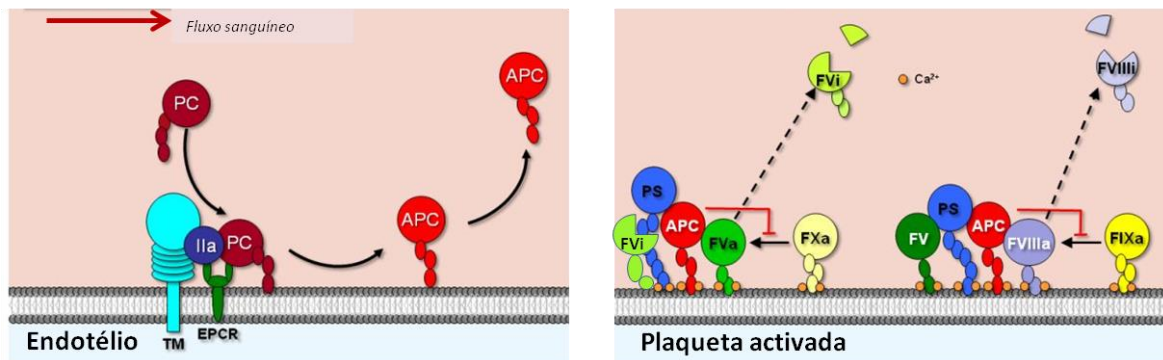


Figura 2. (à esquerda) Ativação da PC pelo complexo TM-Trombina (FIIa)-EPCR; (à direita) Atividade anticogulante da PC: inativação dos FVa e FVIIIa, na presença de cálcio, impedindo a formação dos complexos *protrombinase* e *tenase*, respectivamente. (adaptado de Gerry AFN, 2011 (22))

3.2. Inibição da proteína C activada

A inativação lenta da APC permite-lhe permanecer na circulação o tempo suficiente para evitar a propagação da coagulação nas superfícies fosfolipídicas coagulantes. (28)

As serpinas, inibidor da PC (PCI) e $\alpha 1$ -antitripsina são os principais inibidores da APC, que a inibem no seu estado livre ou ligada ao EPCR. Outros mecanismos inibitórios do sistema anticoagulante da PC incluem o bloqueio da PS e a inibição do complexo T/TM pela antitrombina e PCI. (29, 30)

3.3. Estrutura do gene *PROC* e estrutura primária da proteína C

O gene que codifica a PC – gene *PROC* – é semelhante estruturalmente ao dos factores da coagulação DVK, FIX e FX. Está localizado no braço longo do cromossoma *2q13-14*, abrange 10802 pares de bases (pb), e é constituído por nove exões e oito intrões. O mRNA transcrito codifica uma proteína precursora de 461 aminoácidos (Figura 3). (31, 32)

A região promotora do gene *PROC* é constituída por uma zona não codificante 5'-UTR, da qual faz parte o *exão 1* e cerca de 20pb do *exão 2*. Estas sequências são transcritas para mRNA, no entanto não são traduzidas. Existe um longo intrão que as separa do codão de iniciação; esta característica é única entre os genes dos factores DVK.

A região 5'-UTR não possui TATA-box, à semelhança de alguns genes que codificam proteínas DVK, logo, a regulação da transcrição depende de sequências que circundam os locais de iniciação da transcrição da mesma.

A regulação da transcrição do gene *PROC* tem sido extensivamente estudada. Entre os elementos *cis*, foram identificados os locais de ligação para factores de transcrição, específicos de tecido hepático, HNF (*hepatic nuclear factor*) -1/3 e HNF-1/6; uma região silenciadora e duas potenciadoras, também específicas de tecido hepático. Estas sequências são conservadas no gene *PROC* de espécies ortólogas, ao contrário do que acontece com alguns genes que codificam proteínas DVK. (33-36)

Nestes locais da região promotora foram identificados 3 polimorfismos, que se associam às variações dos níveis de PC entre os indivíduos. (37)

Foster D *et al* (1984) (38) caracterizaram a sequência nucleotídica do gene *PROC*, a partir de cDNA, estabelecendo a numeração adoptada pela maioria dos estudos moleculares posteriores, e referenciada nesta dissertação. No entanto, a numeração adoptada na nomenclatura das alterações encontradas neste estudo é a definida pela HGVS (*Human Genome Variation Society*). (39)

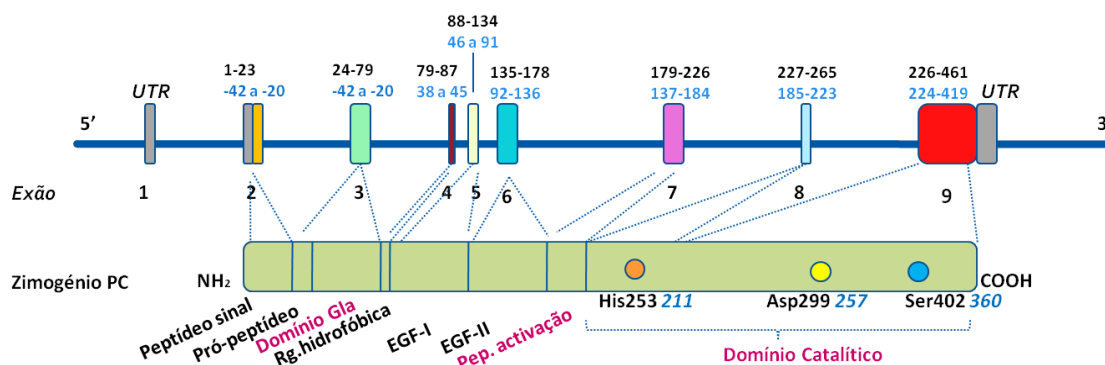


Figura 3. Representação da estrutura exónica e intrónica do gene *PROC*, e dos domínios correspondentes à PC precursora. (numeração de Foster D *et al* (1984) (37) a azul; numeração HGVS (38), a negro. (adaptado de Pavlova A, 2003 (30))

O nucleótido (*nt*) +1, na numeração de Foster D *et al* (38), corresponde ao codão de iniciação -42 ATG/Metionina (Met); na numeração do HGVS este é equivalente ao Met 1.

A proteína precursora é codificada a partir de determinada região do exão 2 até à região não codificante 3'-UTR do exão 9. A sequência codificante do exão 2 codifica a região do peptídeo sinal e parte do pró-peptídeo. O exão 3 corresponde à parte restante do pró-peptídeo e ao domínio *Gla*. O exão 4 codifica uma região de aminoácidos hidrofóbicos, que ligam o domínio *Gla* ao domínio *EGF-like*-I. O exão 5 e o exão 6 codificam os dois domínios *EGF-like* I e II, respectivamente. O exão 7 codifica o dipeptídeo de carácter básico e de carga

positiva Lys198-Arg199 e, também, o peptídeo de activação. (39) Os exões 8 e 9 codificam o domínio catalítico serina-protease, e um *pocket* hidrofóbico. (32)

A PC é inicialmente sintetizada na forma de uma cadeia simples. Após as modificações pós-translacionais, é convertida numa estrutura madura de 419 aminoácidos.

As modificações pós-translacionais incluem a γ -carboxilação de nove resíduos de Glu dando origem ao domínio *Gla*, no terminal-N; a β -hidroxilação do resíduo ácido aspártico 71 (Asp71), e a glicosilação, dos resíduos de asparagina (Asn).

O peptídeo sinal, a sequência pró-peptídica (típica das proteínas DVK), e o dipeptídeo Lys198-Arg199 são removidos por proteólise, dando origem à molécula madura de duas cadeias, - a cadeia leve (terminal-N) e cadeia pesada (terminal-C) -, unidas por uma ponte dissulfídica. A PC madura é então secretada no plasma. (32, 40)

O domínio *Gla* possui uma região de ligação de cálcio (Ca^{2+}). Na presença de cálcio, o domínio *Gla* adquire uma conformação estável, que permite a ligação da PC aos fosfolípidos de carga negativa, na membrana celular das células endoteliais e plaquetas. É por este domínio que se estabelece a ligação ao EPCR. (20, 41, 42)

Os dois domínios *EGF-like* possuem, também, alta afinidade para o cálcio. A sua estrutura difere, em parte, da dos factores DVK, por existir uma ponte dissulfídica entre ambos.

A remoção do peptídeo de activação constituído por 12 aminoácidos (Asp200 – Arg211) é levada a cabo pela clivagem no resíduo Arg211, pela acção dos resíduos de carga positiva da trombina, aquando da ligação da PC ao complexo T/TM. Por este meio, o domínio SP adquire a conformação catalítica, e a PC torna-se activada. (43)

O domínio catalítico SP é característico das tripsinas, por ser constituído por uma tríade catalítica formada pelos aminoácidos His253, Asp299 e Ser402 (Figura 4). (44-46)

A região próxima do local catalítico Ser402, à semelhança da restante estrutura primária da PC, é análoga à dos FX e FIX, entre outras proteínas DVK. Estes factos indicam que as sequências com importância funcional tendem a ser conservadas entre proteínas parálogas, e entre espécies ortólogas, ao longo do processo evolutivo. (47)

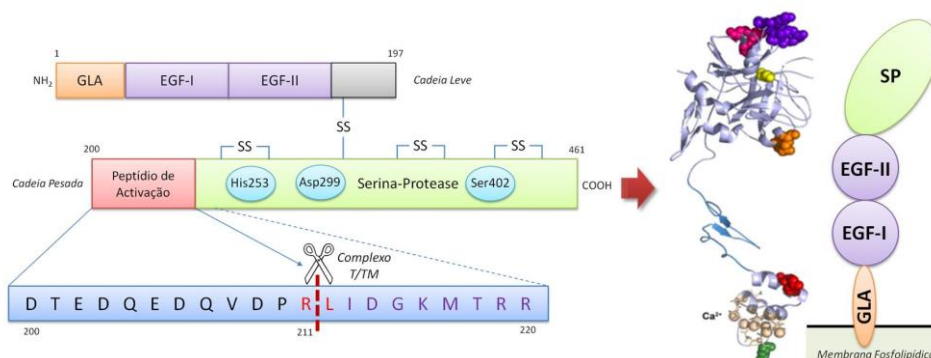


Figura 4. (à esquerda) Zimogênio da PC e sua activação pela clivagem do complexo T/TM, na Arg211; (à direita) Representação da estrutura da APC. Numeração da HGVS (38). (adaptado de Wacey AI, 1993 (44); e <http://www1.imperial.ac.uk/medicine/about/divisions/is/haemo/coag/> (45))

3.4. Deficiência congênita de proteína C

A deficiência congênita de PC, pela presença de alterações no gene *PROC*, compromete o equilíbrio da hemostase a favor da hipercoagulação, e constitui uma das causas hereditárias mais comuns de tendência trombótica.

A prevalência da deficiência heterozigótica de PC atinge aproximadamente 1 em 200 indivíduos, ou seja, cerca de 0,5% da população geral ocidental. Estes indivíduos possuem um risco cerca de sete vezes maior de desenvolver trombose venosa, no entanto a maioria mantém-se assintomática durante a vida - apenas 30% manifestam episódios trombóticos.

A ocorrência de trombose em indivíduos heterozigóticos, para a deficiência de PC, inclui, frequentemente, TVP, TEP e tromboflebite (TF) superficial. A maioria destes indivíduos não desenvolve TVP até atingir a idade adulta, mas aproximadamente 50% manifestam o primeiro episódio tromboembólico até aos 40 anos de idade. (48, 49).

A importância do sistema da PC é, também, demonstrada pela doença tromboembólica severa, associada à deficiência homozigótica e heterozigótica composta de PC, que se manifesta com *purpura fulminans* associada a coagulação intravascular disseminada severa, no período neo-natal. Estes quadros clínicos são caracterizados, essencialmente, por trombose microvascular dérmica. Existem situações em que se desenvolvem manifestações intrauterinas, como trombose fetal cerebral e oftálmica. Nestes indivíduos os níveis de PC são praticamente indetectáveis (<1%).

Por outro lado, em alguns casos, dependendo da alteração no gene *PROC*, as manifestações de trombose venosa ocorrem com menos severidade, embora frequentemente,

com recorrência, a partir da adolescência. Nestes, os níveis de PC podem oscilar entre os 2 e 23%. (50-53)

A prevalência de casos documentados de homozigotia ou heterozigotia composta é baixa, com cerca de 1:4 milhões de neonatos. No entanto, pensa-se que muitos casos possam ser subdiagnosticados devido à frequente ocorrência de abortos precoces e/ou tardios, e à heterogeneidade do déficit de PC na população saudável. (50, 54)

A deficiência de PC heterozigótica é herdada de forma autossômica dominante, com uma penetrância significativamente variável. No entanto, o déficit severo de PC, característico dos indivíduos homozigóticos/heterozigóticos compostos, é transmitido de forma autossômica recessiva. (10)

Estão descritas actualmente cerca de 270 mutações no gene *PROC*, em populações diferentes. Os locais onde ocorrem com mais frequência encontram-se nos exões 3, 7, 8 e 9, que correspondem aos domínios PC, que lhe conferem a capacidade para exercer as suas funções. (55-57)

Os indivíduos com deficiência hereditária de PC podem ser classificados de acordo com os níveis plasmáticos de actividade e antigénio, em dois tipos: tipo I e tipo II. A deficiência do tipo I (quantitativa), a mais frequente, resulta na redução conjunta dos níveis antigénicos e dos níveis de actividade da PC, devido ao decréscimo de síntese, logo a razão *actividade/antigénio* é próxima de 1. A maior parte das mutações que causam deficiência tipo I é devida a alterações nucleotídicas, sendo as mais frequentes as que resultam na substituição de aminoácidos (70%). As mutações *missense* sugerem, muitas vezes, por estudos de modelação molecular, *misfolding* e a instabilidade proteica. As mutações *nonsense* (cerca de 5%) e as mutações pontuais de *splicing* (9%) também se encontram entre as alterações que comprometem as modificações pós-translacionais e consequentemente, a secreção da PC no plasma. A maioria das mutações *missense* resulta no bloqueio da secreção, no entanto algumas permitem-na, embora não plenamente. Os indivíduos homozigóticos para estas últimas apresentam níveis de PC baixos, mas superiores a 1%. As pequenas deleções (8%) e inserções (4%), que introduzem *frameshifts*, resultam em proteínas truncadas. As grandes deleções foram detectadas em cerca de 1% dos casos. (58)

A deficiência do tipo II (qualitativa) caracteriza-se pela síntese, e secreção no plasma, de uma proteína não funcional, implicando uma diminuição acentuada na actividade da mesma, embora os níveis antigénicos se mantenham normais. O *ratio* *actividade/antigénio* é inferior a 1. O tipo II pode ainda dividir-se em tipo IIa e tipo IIb, em função dos resultados dos estudos funcionais dos métodos coagulante e amidolítico. O tipo IIa envolve a redução de ambas as actividades amidolítica e coagulante, enquanto que a deficiência do tipo IIb é

caracterizada apenas pela diminuição da actividade anticoagulante, mantendo-se a actividade amidolítica normal. Este tipo de deficiência é mais raro, e é causado, frequentemente, por mutações *missense*, que afectam os domínios *Gla*, o pro-peptídeo ou o domínio serina-protease. Algumas destas mutações são comuns em determinadas populações, o que sugere a presença de efeito fundador. (32, 58, 59)

España F *et al* (2001) defendem no seu estudo que a redução dos níveis plasmáticos de PC, em indivíduos com história de tromboembolismo, constitui um factor independente de risco para a trombose venosa. Em estudos posteriores, que desenvolveram com os receptores transmembranares da PC, presentes no endotélio, TM e EPCR, revelam que a causa da diminuição dos níveis de PC activada pode dever-se a mutações nos genes dos receptores que participam na sua activação. (60, 61)

Recentemente, tem-se assistido ao desenvolvimento de estudos de genes moduladores da PC. Estes estudos envolvem o *scan* do genoma de indivíduos com trombose venosa, com o objectivo de encontrar marcadores genéticos, que desta forma são associados à tendência trombótica. Este tipo de abordagem é útil para o diagnóstico de doenças complexas e multifactoriais, como a trombose venosa. (62)

Numa tentativa de compreender melhor os mecanismos de regulação da PC, foi efectuado o estudo ARIC (*Atherosclerosis Risk In Communities*), em cerca de 8000 indivíduos, tendo sido identificados cinco *loci* independentes associados à regulação dos níveis plasmáticos de PC. (63-65)

Vários estudos têm relacionado uma diminuição da concentração de PC com 3 polimorfismos (SNPs - *single nucleotide polymorphisms*) na região promotora do gene *PROC*, como já foi referido anteriormente. Estes 3 SNPs funcionais (-1654C>T, -1641A>G e -1479A>T) têm efeito na transcrição do gene *PROC* e, consequentemente, afectam os níveis plasmáticos da PC. Indivíduos portadores do genótipo CGT, em homozigotia, têm níveis plasmáticos mais baixos de PC, possuindo um risco trombótico acrescido, do que os indivíduos com o genótipo TAA, que se pensa conferir um efeito protector. (66)

4. Objectivos do estudo

Como objectivo principal, este estudo pretende efectuar uma correlação genótipo/fenótipo em famílias com história de trombose venosa e níveis plasmáticos de PC persistentemente baixos (ou próximo do valor de limite da normalidade).

Como objectivo específico, efectuar a correlação das mutações encontradas no gene *PROC* e a presença dos haplótipos CGT e TAA em homozigotia dos polimorfismos da região promotora -1654C>T, -1641A>G, -1479A>T, com os níveis plasmáticos de PC.

5. Questões éticas

O estudo será efetuado com o consentimento informado dos doentes e respeitando os princípios da Declaração de Helsínquia, tendo por base uma boa prática clínica, a confidencialidade dos dados obtidos e a máxima proteção dos intervenientes.

6. A importância do estudo

O estudo molecular da PC, em membros de famílias portuguesas, com história clínica de trombose venosa, permitirá identificar mutações e identificar possíveis portadores.

Nos casos mais severos, após a identificação dos portadores, poder-se-à efectuar o diagnóstico pré-natal, quando solicitado.

A importância clínica e social deste estudo reside na identificação de factores de risco congénitos, além de que permitirá vigilância a indivíduos portadores assintomáticos e implementação de profilaxia quando necessário.

II – Material e Métodos

Material e Métodos

1. População de estudo

O estudo foi efectuado num grupo de 38 indivíduos que apresentavam níveis de PC diminuídos ou *borderline*, pertencentes a 13 famílias, aparentemente não relacionadas, seguidos no Departamento de Hematologia/Consulta de Hemostase do Centro Hospitalar de Coimbra (CHC), com o seu consentimento informado.

As características clínicas dos doentes foram colectadas atendendo à história pessoal e/ou familiar de trombose, e factores de risco adquiridos. A média de idades dos propósitos, ao primeiro episódio tromboembólico, foi 32 ± 11 anos; 11 indivíduos do sexo masculino e 15 indivíduos do sexo feminino.

Das 13 famílias, 12 propósitos têm história pessoal de trombose venosa, enquanto que 1 foi estudado no âmbito de história familiar. Dos 12 propósitos, 1 apresenta morte fetal por trombose placentar. Os episódios de tromboembolismo incluem: TF, TVP e TEP.

Os factores adquiridos para risco trombótico observados na amostra incluem a imobilização; sedentarismo; varizes; a toma de contraceptivos orais (pílula); puerpério; intervenções cirúrgicas; HTA (hipertensão arterial); tabagismo; diabetes; obesidade. (Tabela 1)

2. Colheita e processamento das amostras

Para a realização dos estudos funcionais e imunológicos (determinação de níveis plasmáticos de PC) foram utilizadas amostras de sangue colhidas por punção venosa atraumática, com o sistema de recolha por vácuo Vacutainer® (Beckton Dickinson), em tubos de vácuo de 3 mL (Vacuette, Greiner bio-one, Germany) e anticoaguladas com citrato de sódio (9:1 v/v, com citrato trissódico 0,129M pH 7,4). As amostras obtidas foram centrifugadas a 1200-1500g durante 15 minutos, para a obtenção de plasma pobre em plaquetas, que se distribuiu em alíquotas. Para posterior realização dos estudos funcionais foram armazenadas a -20°C.

Os estudos moleculares foram realizados em amostras de sangue total obtidas igualmente por punção venosa atraumática, mas anticoaguladas com K₃EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético tripotássico: 1.5 ± 0.15 mg/mL sangue), e congeladas a -75°C até se proceder ao isolamento de DNA.

Tabela 1. Dados clínicos dos *proposita*.

Famílias (<i>proposita</i>)	Idade/Sexo	Episódios TE (idade/anos 1ºEp)	Factores de risco adquiridos (no 1º TE)	Episódios TE (recorrência)	Nº Famíliares c/TE
<i>PCI</i>	47/F	TF (35)	Fractura do menisco; imobilização	TFr (39; 44)	0
<i>PCII</i>	39/F	Não	Pílula; tabagismo	Não	1
<i>PCIII</i>	74/F	TF (44)	HTA ; diabetes	TEP (64)	0
<i>PCIV</i>	43/F	2 MFs 34/30 S por trombose placentar (32)	Não	Não	0
<i>PCV</i>	40/M	TF (21)	Não	TF (22;23)	0
<i>PCVI</i>	28/F	TVP + TEP (19)	Pílula	Não	0
<i>PCVII</i>	39/M	TVP (33)	Sedentarismo	Não	0
<i>PCVIII</i>	75/F	TVP (34)	Puerpério	Não	1
<i>PCIX</i>	33/F	TVP (26)	Pílula; imobilização prolongada (36horas)	Não	0
<i>PCX</i>	40/F	TVP (19)	Não	TF (21; 22)	1
<i>PCXI</i>	51/M	TVP (46)	Cirurgia a varizes; obesidade; sedentarismo	Não	0
<i>PCXII</i>	60/M	TVP (56)	Varizes; fumador; deslipidémia	TF (57)	1
<i>PCXIII</i>	34/F	TVP (24)	Pílula	Não	0

A numeração romana é usada para identificar as famílias; TE- episódios tromboembólicos; 1º Ep. – primeiro episódio trombótico; TVP-trombose venosa profunda; TEP-tromboembolismo pulmonar; TF- tromboflebite; MFs – mortes fetais; r – recorrente; M-masculino; F-feminino; S-semanas

2.1. Método de seleção das amostras

O tipo e técnica de amostragem, e dimensão da amostra, foi não probabilística e de conveniência.

As amostras seleccionadas com actividade diminuída de PC, foram confirmadas pelo menos em duas determinações; posteriormente, foram determinados os valores de PC antigénica, com o objectivo de definir o tipo de défice.

Uma vez confirmada a deficiência de PC dos propósitos, foram convocados os respectivos familiares; procedeu-se da mesma forma, para confirmar os valores plasmáticos de PC. Aos propósitos e familiares que apresentaram valores de PC diminuídos ou *borderline*, foram realizados o estudo molecular do gene *PROC*.

3. Metodologias

3.1. Determinação da actividade da proteína C por substrato cromogénico

O estudo funcional da PC realizou-se pela determinação quantitativa da sua actividade por um ensaio cromogénico automatizado (HemosIL™ Protein C – IL Coagulation Systems).

Este método consiste na activação *in vitro* da proteína C pela fracção proteica derivada do veneno de víbora *Agkistrodon contortrix contortrix*, seguida da quantificação da PC activada, que exerce actividade catalítica sobre um substrato cromogénico sintético, a paranitroanilina (Figura 5). A cor libertada por este último é medida cineticamente a 405nm. A actividade de PC é determinada a partir de uma curva de calibração, efectuada com plasma de referência da casa comercial, sendo directamente proporcional à absorvância da cor libertada.

Os valores de referência normais, adoptados pelo Laboratório de Hemostase, estão representados na Tabela 2. (67)

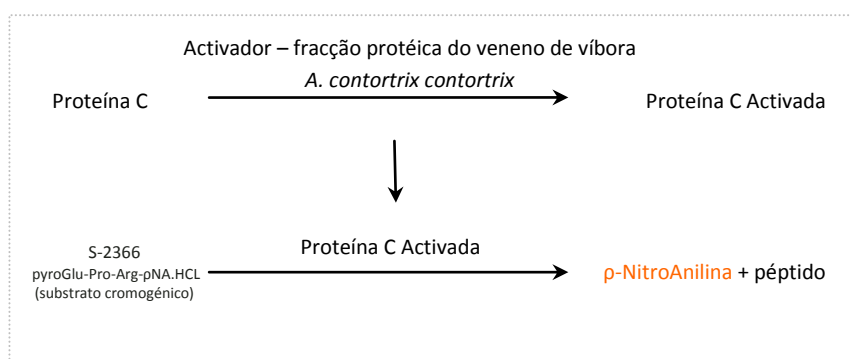


Figura 5. Representação das reacções na determinação quantitativa da actividade de PC, por um ensaio cromogénico. (adoptado da bula do kit de determinação da actividade de PC HemosIL™ Protein C – IL) (66)

3.2. Doseamento da proteína C antigénica por imunoensaio

Os níveis antigénicos plasmáticos de PC foram determinados por uma técnica imunológica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) tipo *sandwich* comercial (DG-EIA PC – Grifols, Corgenix™). A placa de poliestireno é revestida por um anticorpo específico anti-PC humana. A PC da amostra que se ligar será detectada pela formação de cor, resultante da reacção de um anticorpo de detecção conjugado com peroxidase de rábano com um substrato cromogénico (TMB-tetrametilbenzidina) e peróxido de hidrogénio, posteriormente adicionados. A intensidade da cor, medida por unidades de densidade óptica a 450nm, é directamente proporcional à concentração de PC na amostra. A quantidade de PC é determinada contra uma curva de calibração, realizada a partir de plasma de referência, disponibilizado no *kit* comercial de ELISA.

Os valores de referência normais, adoptados pelo Laboratório de Hemostase, estão representados na Tabela 2. (68)

Tabela 2. Valores referência normais dos níveis de PC.

	PC Actividade %*	PC Antígeno %**
Adulto	70-140	72-160

*adoptados da bula do *kit* de determinação da actividade de PC *HemosILTM Protein C* – IL (66);

** Adoptados da bula do *kit* de determinação do antígeno de PC– DG-EIA PC Grifols. (67)

3.3. Estudo molecular do gene *PROC*

3.3.1. Extracção de DNA

O DNA genómico obteve-se a partir de sangue venoso periférico anticoagulado em K₃EDTA, a partir de um ensaio comercial (JETQUICK Blood & Cell Culture Spin Kit, Genomed GmbH, QiagenTM), de acordo com o protocolo apresentado pelo fabricante, que utiliza a proteinase K e um agente caotrópico (*guanidine hydrochloride*) para desnaturar estruturas proteicas, e colunas de sílica que permitiram a eluição e purificação adequadas. A eluição do DNA foi feita com água destilada. Os eluados de cada amostra foram conservados a 4°C ou armazenados a -80°C, para posterior utilização.

3.3.2. Amplificação do gene *PROC* por reacção de polimerase em cadeia (PCR) convencional

Foram amplificados os fragmentos correspondentes à região promotora, aos oito exões e às respectivas regiões flanqueantes intrónicas do gene *PROC*.

Por definição, as regiões do gene *PROC* dos propósitos que apresentaram alterações genéticas foram posteriormente amplificadas e estudadas nos respectivos familiares.

O gene *PROC* e os fragmentos a amplificar foram estudados e definidos através da base de dados genética *VEGA (Vertebrate Genome Annotation)*. (69) Foi adoptada a numeração de Foster D *et al* (1985) (38) para definir a sequência nucleotídica nativa do gene *PROC*. Nesta fase, a numeração do HGVS foi considerada para comparação, quando necessário.

Os *primers* usados para a amplificação do gene *PROC* foram adoptados de Badenes PM (2005) (70) e de Watanabe K *et al* (2003) (71), excepto os correspondentes à região promotora, que foram desenhados no Laboratório de Hemostase. A síntese dos *primers* foi encomendada à empresa TIB®MOLBIOL Syntheselabor GmbH, a uma escala de 0.02 µm, 30D.

Das soluções *stock* de *primers* (armazenadas a -20°C) foram elaboradas soluções de trabalho de concentração final 50 ng/µL (Tabela 3).

Tabela 3. Características da sequência dos *primers* utilizados na amplificação do gene PROC.

Exões (PC) a amplificar	Sequência <i>primers</i> (5'-3')	Nº nt (mer)	% GC	T°Cm	[<i>primers</i>] ng/µL
PC1†	F: CAGCCACTATGGGGCTAAAA	20	50	54.2	129
	R: CTCCAGGCAGGTCTATGAGG	20		50.1	125
PC2*	F: ACT GCC CGG AGC TCA GAA GT	20	60	61.0	129
	R: ATG CCA CCA GGG CCT TGT AG	20		61.5	129
PC3*	F: AGC TCT GCT TCC TCA GAC CC	20	60	57.9	126
	R: CCC TGC TGG TTA CCA GCT CG	20	65	62.3	127
PC4+5**	F: CTGACGCTGCCCGCTCTCTCC	21	71.4	67.3	132
	R: GCATCCACCTCTCCCCTCAC	21	66.7	63.3	130
PC6**	F: GCCCTCCCCTGCCCCGCA	17	82.4	68.6	106
	R: CCTGGGCGATGTATTGGGGGC	21	66.7	67.4	138
PC7*	F: CTT GAA CCC TGC ACT GTG GC	20	60	61.1	128
	R: CGC TTC CCT CTC GGT TTC TG	20		60.9	127
PC8*	F: CTA AGC CTA TGC CCA TAT GA	20	45	51.0	128
	R: AAG AAG CCT CTT GCT TAA GC	20		53.2	128
PC9*	F: GGC CTC AGG AAA GTG CCA CT	20	60	61.0	129
	R: AGA ACA GCA GGC CGG TGT GC	20	65	65.4	130

F: forward (primer directo); R: reverse (primer reverso); nº nt.: número de nucleótidos (mer); %GC: percentagem de dinucleótidos GC; T°Cm: temperatura de *melting* correspondente a cada primer: concentração da solução *stock* de *primers* em ng/µL. *-sequências adoptadas de Badenes PM (2005) (69); ** - sequências adoptadas de Watanabe et al (2003) (70);

† - os oligonucleótidos PC1 correspondem a um fragmento da região promotora que abrange os polimorfismos -1654 C>T, -1641 A>G, -1479 A>T e a mutação -13A>G; foram desenhados pelo Laboratório de Hemostase

A concentração de cloreto de magnésio (MgCl₂) foi otimizada e adicionada aos *primers*. Na Tabela 4 são apresentados os volumes de *primer*, MgCl₂, e a temperatura de *annealing* para cada *kit*, num volume total de 70 µL.

Tabela 4. Kits de *primers* para exões 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9 num volume total de 70 µL.

Kits Iniciador/Exão	<i>Primer</i> directo (µL)	<i>Primer</i> Reverso (µL)	MgCl ₂ 50mM (µL) Invitrogen™	T°C <i>annealing</i>
PC 1, 2, 3, 7, 8	25	25	15	56
PC 6, 9	25	25	10	55

O protocolo de amplificação foi otimizado a partir de um protocolo de base já existente, e de acordo com as recomendações dos fornecedores. Na Tabela 5 são apresentadas as condições da optimização da PCR utilizadas para amplificar os exões 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, e respectivas regiões intrónicas circundantes.

Tabela 5. Protocolo da *master-mix* dos exões 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9 e regiões intrônicas flaqueantes correspondentes.

<i>Master-Mix</i> Exões 1,2,3,6,7,8,9	[componentes]	Volume por amostra	Casa comercial fornecedora
PCR Buffer, <i>minus</i> MgCl ₂	10x	5µL	Invitrogen™ Kit 1.25mL
dNTPs (<i>dATP, dGTP, dCTP, dTTP</i>)	2.5mM	4µL	Invitrogen™ kit 100mM
<i>Platinum®</i> Taq DNA Polimerase	5U/ µL	0.4µL	Invitrogen™ kit 50 µL
DNA	-	3µL	-
mQH ₂ O	-	30.6µL	Labesfal®
Kits <i>primers F+R</i>	50 ng/µL	7µL	Tib Molbiol™
Volume Total <i>Master-Mix</i> /amostra		50 µL	

A amplificação dos exões 4+5 foi otimizada num protocolo distinto, e dado o conteúdo de GC tornou-se necessária uma enzima *GC-rich* (Roche™). Na Tabela 6 é descrito o protocolo de amplificação dos exões 4+5, e regiões intrônicas flanqueantes.

Tabela 6. Protocolo da *master-mix* dos exões 4+5 e regiões intrônicas flaqueantes correspondentes.

<i>Master-Mix</i> Exões 4+5	[componentes]	Volume por amostra	Casa comercial	fornecedora
GC-Rich PCR reaction buffer com 1.5mM MgCl ₂ e DMSO	5x	10µL	Roche™	
dNTPs (<i>dATP, dGTP, dCTP, dTTP</i>)	2.5mM	4µL	Invitrogen™ kit 100mM	
GC Rich Enzyme Mix	2U/ µL	1µL	Roche™ kit 50 µL/100U	
DNA	-	3µL	-	
PCR grade H ₂ O	-	30.5µL	Roche™	
<i>Primers F e R</i>	50 ng/µL	0.75µL	Tib Molbiol™	
Volume Total <i>Master-Mix</i> /amostra		50 µL	T°C <i>annea</i>	Exões 4+5 57°C

Foram utilizados termocicladores Biometra T Personal e Biometra Basic, para a amplificação do gene *PROC*. O protocolo de amplificação do gene *PROC* está descrito na Tabela 7.

Tabela 7. Protocolo de amplificação por PCR convencional do gene *PROC* otimizado no Laboratório de Hemostase.

Etapas	Condições de temperatura	Tempo	Nºciclos
Desnaturação	94°C	3'	2x 33
	94°C	20''	
Emparelhamento	55 °C /56°C /57 °C	30''	
Extensão/síntese	72 °C	1'	
	72 °C	5'	
Pausa	22 °C		
Armazenamento	4°C		

' – minutos; '' - segundos

3.3.3. Electroforese dos produtos de amplificação

Os produtos de PCR foram submetidos a uma electroforese em gel de agarose a 2%, (Ultrapure™ agarose – Invitrogen) numa solução tampão de TBE 0.5x (Sigr), para a verificação do tamanho (pb) dos fragmentos pretendidos, especificidade e rendimento da reacção, contra um marcador de peso molecular de 100 pb (DNA ladder 100bp - Invitrogen). Para o gel, foi usado para o corante Sybr® Safe DNA stain, em DMSO (Molecular Probes – Invitrogen). Para os produtos de amplificação usou-se um *loading buffer* 10x (Takara).

Os fragmentos de amplificação foram visualizados e fotografados através de um transiluminador de ultra violeta (Kodac EDAS 290; Vilber Lourmat – UV) (Figura 6).

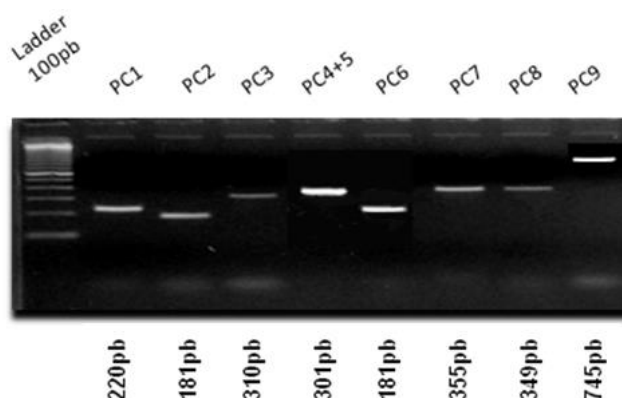


Figura 6. Padrão electroforético dos exões e regiões flaqueantes do gene *PROC* (os exões estão identificados como PC1,etc).

3.3.4. Sequenciação do gene *PROC*

Após a verificação dos produtos de PCR, partiu-se para a sequenciação dos fragmentos correspondentes aos exões e regiões intrónicas flanqueantes do gene *PROC*.

Primeiramente, procedeu-se à purificação dos produtos da amplificação, por um método enzimático.

3.3.4.1. Purificação dos produtos de PCR por método enzimático

Para prosseguir para a reacção de sequenciação nucleotídica directa efectuou-se a remoção dos nucleótidos não incorporados e dos primers da reacção de PCR anterior, para a obtenção de produtos de PCR puros para a sequenciação directa.

O método utilizado (ExoSAP-IT®, USB Corporation, USA) compreende a acção de duas enzimas: a exonuclease I, que degrada os primers e DNA residual em cadeia simples; e a fosfatase alcalina de camarão, que hidrolisa os dNTPs.

As enzimas são adicionadas directamente ao produto de PCR, num volume total de 10 µL: 2µL de ExoSAP-IT® com 8 µL de produto de PCR. A mistura incuba 15 minutos a 37°C, temperatura favorável à acção das enzimas. Depois do tratamento, a inactivação destas é efectuada pela incubação a 80°C, durante 15 minutos.

3.3.4.2. Sequenciação nucleotídica directa dos produtos de PCR purificados

A sequenciação dos produtos de PCR purificados pelo método enzimático, correspondentes aos fragmentos exónicos do gene *PROC*, baseou-se no método enzimático de Sanger *et al* (1977). (72)

Preparou-se a reacção de sequenciação com o kit de sequenciação ABI Prism BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems), que fornece o tampão, ddNTPs marcados com quatro fluorocromos correspondentes às bases A, T, C, G; dNTPs, e DNA polimerase, apenas num preparado. A 2 µL de kit BigDye® Terminator, adiciona-se 0,5 µL de primer directo ou reverso (solução de trabalho 50 ng/ µL), e 2,8 µL de produto de PCR purificado.

Na Tabela 8 é apresentado o protocolo de sequenciação nucleotídica directa utilizado.

Tabela 8. Protocolo de sequenciação dos exões e zonas flanqueantes do gene *PROC* optimizado no Laboratório de Hemostase.

Etapas	Condições de temperatura	Tempo	Nºciclos
Desnaturação	94°C	3'	25
	96°C	10''	
Emparelhamento	50°C	5'	
Extensão/síntese	60°C	4''	
Pausa	22 °C		

' – minutos; '' - segundos

3.3.4.3. Purificação dos produtos de sequenciação

Posteriormente à reacção de sequenciação, procedeu-se à purificação dos produtos de sequenciação em colunas de purificação DyeEx™ 2.0 (Qiagen), de acordo com as recomendações do fornecedor. Tratam-se de colunas de gel pré-hidratado prontas a usar,

adaptadas para centrifugação. A sua função consiste em remover os ddNTPs não incorporados durante a sequenciação.

Após a centrifugação prévia das colunas, em vácuo, transferiu-se o produto de sequenciação, pipetando todo o volume da reacção para o gel. Centrifugou-se de novo para se obterem as sequências livres de ddNTPs em excesso.

As sequências são então centrifugadas em vácuo a 60°C durante 10 a 15 minutos. Por fim, hidratam-se com 20 µL de formamida HiDi™ (Applied Biosystems).

Por fim, as sequências são transferidas para uma microplaca óptica, o que permite a sua leitura num analisador por electroforese capilar.

3.3.4.4. Electroforese capilar em sequenciador automático

O analisador genético por electroforese capilar (ABI Prism 3130 Genetic Analyser Applied Biosystems) foi usado para separar, por tamanho e carga eléctrica, os produtos da sequenciação marcados com fluorocromos, e converter o sinal de fluorescência detectado, num sinal digital, que possa ser analisado num programa de análise de sequências.

As sequências a analisar, aplicadas (20 µL) numa microplaca óptica, são submetidas a uma carga eléctrica de alta tensão que permite a sua entrada nos capilares (injecção electrocinética). Os capilares são preenchidos com um tampão que fornece iões para promover a corrente eléctrica.

O método de electroforese capilar utilizado envolve o uso de um polímero com um agente desnaturante, em vez de gel, que promove a separação das sequências de DNA por tamanho e carga eléctrica. O polímero é injectado nos capilares, e minimiza o fluxo electro-osmótico, que é contrário ao do movimento das sequências de DNA. Os fragmentos de DNA possuem carga negativa e migram para o eléctrodo positivo, sendo separados consoante o seu peso molecular, baseado na sua carga eléctrica total. Antes do eléctrodo positivo, os fragmentos atravessam um feixe *laser*, e cada um dos quatro fluorocromos ligados, correspondentes a cada base, emitem fluorescência, que é captada por um detector óptico. O programa do analisador, *Data Collection*, converte o sinal de fluorescência num sinal digital. Os quatro fluorocromos, correspondentes às quatro bases, emitem luz a diferentes comprimentos de onda, o que permite a sua detecção simultânea num só capilar.

O programa *Sequencing Analysis* permitiu analisar as sequências quanto à qualidade da leitura das bases, discriminando, segundo critérios previamente especificados, as de alta, média e baixa qualidade. Desta forma, pôde-se aceitar ou rejeitar a análise de determinada sequência.

3.3.4.5. Análise das sequências do gene *PROC*

O programa *SeqScape*® v.2.6 (Applied Biosystems) possibilitou a análise das sequências lidas comparando-as com a sequência nucleotídica nativa do gene *PROC*, previamente definida neste *software*, com a numeração de Foster *et al.* (1984) (38) obtida através do Genbank, número de acesso AF378903.2 (Figura 7). (73)

Sempre que não ocorreu o emparelhamento entre a sequência nativa e as sequências em análise, repetiu-se todo o procedimento num novo produto de PCR. Se se confirmou a alteração, a sua posição na sequência foi identificada pela numeração de Foster *et al.* (1984). (38) A alteração foi, então, localizada na base de dados genética internacional HGMD – *Human Gene Mutation Database* (57), e na base de dados de mutações da PC, *ProCMD – 3D Protein C Mutations Database*. (56)

A nomenclatura utilizada para mencionar as alterações no gene *PROC*, está de acordo com den Dunnen *et al.* (2000) (74). A numeração adoptada para enunciar, neste trabalho, as alterações encontradas é a usada pela HGVS (39), que é referida pela base de dados genética HGMD (57). Nesta última, constam as alterações no gene *PROC* descritas previamente em outras populações. A numeração de Foster *et al.* (1984) (38) é indicada paralelamente, uma vez que é frequente a sua utilização na literatura.

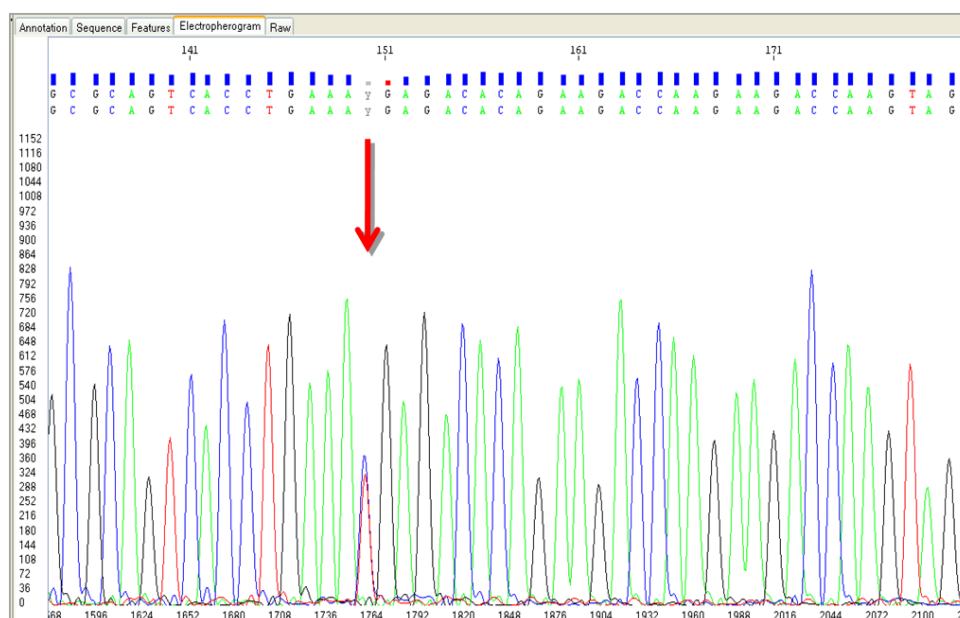


Figura 7. Exemplo de electroferograma do programa *SeqScape*® : mutação em heterozigotia no exão 7 do gene *PROC*.

3.3.4.6. Modulação molecular

O conjunto de substituições de aminoácidos não sinónimos na região codificante de uma proteína pode exercer um grande impacto no fenótipo, nomeadamente, quando se trata de doenças multifactoriais.

Com o objectivo de interpretar possíveis alterações funcionais, provocadas por mutações *missense*, efectuou-se a sua modelação molecular através de programas, *SIFT* (*Sorting Intolerant From Tolerant*) (75), e *Polyphen* (*Polymorphism Phenotyping*) (76), que prevêem o possível impacto da troca de aminoácido na estrutura e função da PC, e consequentemente, o fenótipo.

O programa *SIFT* defende que, os aminoácidos importantes estarão situados em regiões conservadas entre as sequências de uma família de proteínas, logo, alterações aí localizadas poderão comprometer a funcionalidade, sendo consideradas como intolerantes para a maioria das substituições de resíduos. Pelo contrário, um aminoácido que não seja conservado entre as sequências homólogas, a sua substituição é potencialmente tolerante. Pelo algoritmo usado (*PSI-BLAST - Position-Specific Iterative- Basic Local Alignment Search Tool*), depois do alinhamento das sequências homólogas com a sequência em análise, o programa calcula a probabilidade de *tolerância* para cada um dos 20 aminoácidos possíveis, para a posição da substituição. O *score* que o *SIFT* atribui a cada aminoácido potencialmente possível, será menor que um determinado valor de *threshold*: se ≤ 0.05 é considerada *Deleterious*; se ≥ 0.05 até 1.00, *Tolerant*. (77, 78)

No *Polyphen* a previsão é baseada na informação estrutural e filogenética, que caracterizam a substituição, e na caracterização da sequência onde esta está localizada. A partir do *score* (*PSIC - Position-specific independent counts*) atribuído a ambas as variantes alélicas, calculado pela semelhança estrutural/química entre o aminoácido *wild-type* e o variante, o *Polyphen* determina um valor absoluto, correspondente à diferença entre os *scores*: valores elevados podem indicar que a substituição em causa raramente ou nunca será observada na família proteica. A classificação das previsões compreende 3 graus: *benign* (≤ 0.5); *possibly damaging* e *probably damaging* (≥ 0.5). (79)

Para a modulação molecular das mutações *missense* encontradas, foi necessária a sequência protéica da PC em formato FASTA (>gi|190334|gb|AAA60166.1| Protein C [Homo sapiens]), obtida através do *GenBank Database*. (80)

Foi ainda esquematizado o alinhamento múltiplo relativo a sequências protéicas de quatro espécies ortólogas diferentes (porcinos-*Sus scrofa*; murinos- *Mus musculus* e *Rattus*

norvegicus; caninos-*Canis lupus familiaris*), com o objectivo de verificar a conservação dos aminoácidos, onde foram encontradas mutações *missense*. (56, 57)

3.3.4.7. Análise estatística dos haplótipos GGT e TAA em homozigotia dos polimorfismos -1654 C>T, -1641 A>G e -1479 A>T do promotor do gene *PROC* na população-controlo

A análise da prevalência dos polimorfismos do promotor no gene *PROC*, encontrados nos indivíduos estudados, foi comparada com estudos europeus referenciados (37, 81-83), e com uma população-controlo portuguesa. Esta última população-controlo foi estudada por outros autores, no âmbito de um trabalho previamente efectuado no Departamento de Hematologia, na Unidade de Hemostase Molecular; constitui uma amostra de 52 indivíduos saudáveis (foi excluída história pessoal e familiar de trombose venosa), em que foi analisada a relação dos níveis de PC com os haplótipos CGT e TAA em homozigotia. (84)

Para tal, foi comparada a média de actividade de PC (%) dos indivíduos da amostra-controlo que apresentaram os haplótipos CGT e TAA em homozigotia. Procedeu-se ao cálculo do intervalo de confiança (IC) de 95%, para averiguar se a diferença entre elas era estatisticamente significativa, e a respectiva probabilidade, p ($p < 0.05$, assumido como estatisticamente significativo), pela utilização do teste paramétrico *t-student* para duas amostras independentes. Os dados foram analisados no programa GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, CA), versão 5.00.

Foi demonstrado que, tal como está referido na literatura, os níveis de actividade de PC estão mais diminuídos quando está presente o haplótipo CGT, comparativamente aos daqueles que apresentam o TAA, ambos em homozigotia ($p = 0.0375$; IC: -30.22 a -1.03). (Tabela 9) (84)

Tabela 9. Comparação das médias de actividade de PC dos indivíduos-controlo, que apresentam CGT e TAA em homozigotia.

Genótipo/haplótipo	n	PC Act ¹ Média (%)
CC/GG/TT (CGT/CGT)	9	100
TT/AA/AA (TAA/TAA)	8	116
$p = 0.0375$; IC: -30.22 a -1.03		

PC Act¹ – níveis de actividade de PC (70-140%); $p < 0.05$, IC (intervalo de confiança) de 95%

II – Resultados e Discussão dos Resultados

Resultados e Discussão dos Resultados

O estudo de trombofilia funcional de 13 *proposita* com história pessoal/familiar de trombose venosa, revelou deficiência de PC tipo I, confirmada pelo estudo molecular do gene *PROC*.

Os estudos familiares contaram com 25 indivíduos, dos quais 12 revelaram níveis de PC (actividade e antigénio) normais; e 13 níveis diminuídos e/ou *borderline*, cujo défice foi confirmado pelo estudo molecular do gene *PROC*.

Dos 26 indivíduos com deficiência de PC, metade manifestaram trombose venosa (13 propósitos e 1 familiar) (Figura 8).

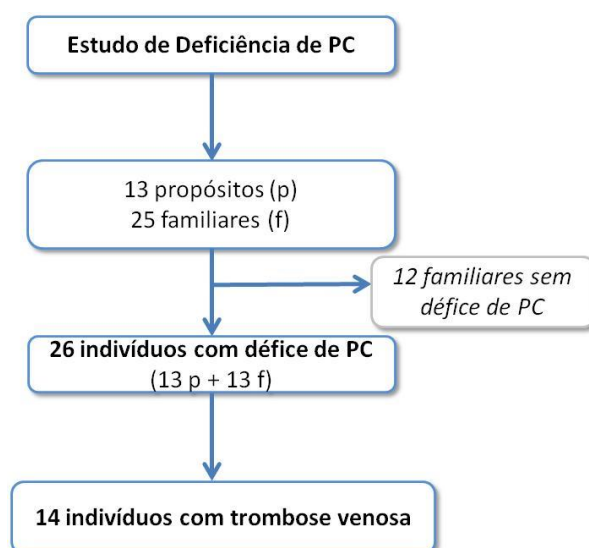


Figura 8. Flow chart do estudo das famílias com deficiência de PC.

Apesar do número de indivíduos da amostra estudada ser reduzido, estes resultados estão de acordo com os dados da incidência de trombose venosa em indivíduos com défice de PC: cerca de 50% dos indivíduos com défice de PC desenvolvem tromboembolismo até aos 40 anos de idade. (48, 49)

Estudos moleculares do gene *PROC* em famílias com défice de PC

Os níveis de PC (antigénio e actividade) dos 26 indivíduos com deficiência tipo I, e o respectivo genótipo são indicados na Tabela 10, tal como o genótipo dos três polimorfismos da região promotora do gene *PROC* nas posições – 1654C>T, -1641A>G e -1479A>T.

Tabela 10. Os indivíduos com mutação no gene *PROC*: níveis de PC, genótipo de polimorfismos no promotor e de genes moduladores.

Família	PC Act ¹ (Média)	PC Ag ² (Média)	Mutação	Local	Polimorfismos no Promotor gene <i>PROC</i>		
					-1654C>T	-1641 A>G	-1479A>T
PCI	38	41	g.-13 A>G (<i>g.-1533A>G</i>)	Prom.	CT	AA	AA
PCII	52	51		Prom.	TT	AA	AA
	45 (38-52)	46(41-51)					
PCIII	AO	AO	c. 595 C>T; p. Arg199X (157)	Ex.7	CC	GG	TT
<i>PCIIIa</i>	43	45		Ex.7	CC	GG	TT
PCIV	51	48		Ex.7	CC	GG	TT
PCV	AO	AO		Ex.7	CC	GG	TT
<i>PCVa</i>	ND	53		Ex.7	CC	AG	AT
PCVI	40	44		Ex.7	CC	AG	AT
PCVII	54	59		Ex.7	CC	GG	TT
PCVIII♣	66	59		Ex.7	CC	GG	TT
PCVIIIa♥	49	46		Ex.7	CC	AG	AT
	50.5 (40-66)	50.3 (44-59)					
PCIX	57	59	c. 629 C>T; p.Pro210Leu (168)	Ex.7	CC	AG	AT
<i>PCIXa</i>	73	74		Ex.7	CC	AG	AT
<i>PCIXb</i>	71	73		Ex.7	CC	AG	AT
<i>PCIXc</i>	60	53		Ex.7	CC	AG	AT
	65.3(57-73)	64.8(53-74)					
PCX	36	45	c.633-634; p.Leu212HisX2 (170)	Ex.7	CT	AG	AT
<i>PCXa</i>	49	55		Ex.7	CT	AA	AA
	42.5(36-49)	50(45-55)					
PCXI ♠	58	65	c.659G>A; p.Arg220Gln (178)	Ex.7	CC	AA	AA
<i>PCXIa</i>	59	61		Ex.7	CC	AA	AA
<i>PCXIb♠</i>	64	65		Ex.7	CC	AG	AT
<i>PCXIc</i>	19♦	20♦		Ex.7	CC	AA	AA
<i>PCXIa[§]</i>	58	66		Ex.7	CT	AA	AA
	59.8(58-64)	64.3(61-66)					
PCXII	60	64	c. 715 G>A; p.Gly239Arg (197)	Ex.8	CC	AA	AA
PCXIII	ND	45	c.1015G>A; p.Val339Met (297)	Ex.9	CT	AG	AT
<i>PCXIIIa</i>	ND	41		Ex.9	CT	AG	AT
<i>PCXIIIb</i>	37	41		Ex.9	CT	AG	AT
	37	42.3(41-45)					

PC Act¹ – valores referência normais de actividade de proteína C: 70-140%; PC Ag² – valores referência normais de antígeno de proteína C: 72-160%; Prom. – região promotora do gene *PROC*; **a negrito** – os propósitos; a,b,c,d – identificação dos familiares respectivos a cada propósito; ♣- heterozigótico para FVL; ♥ - heterozigótico para FVL e PRT 20210 G/A; ♠- heterozigótico para PRT 20210 G/A; ♦- mutação em homozigotia; § - **único familiar com trombose venosa**. ND: valores não disponíveis; AO: sob anticoagulação oral. A nomenclatura usada é sugerida pela HGVS (38), com referência, em *itálico*, à numeração segundo Foster *et al* (1985) (37).

Os estudos moleculares revelaram 7 mutações diferentes, todas previamente descritas: 1 mutação reguladora (g.-13A>G) na região promotora do gene *PROC*; 1 *nonsense* (p.R199X); 1 pequena deleção (p.L212Hfs*2); e 4 *missense* (p.P210L; p.R220Q; p.G239R; p.V339M).

A maioria das mutações ocorreu no exão 7 (4), as restantes no exão 8 (1); no exão 9 (1) e na região promotora (1). Oito famílias apresentam a mesma mutação: 2 famílias a mutação g.-13 A>G na região promotora, e 6 famílias a mutação *nonsense* p. R199X, no exão 7.

Dos indivíduos com mutações no gene *PROC*, apenas 1 (PCXIc) apresenta a mutação em homozigotia; os restantes 25 são heterozigóticos.

A presença de alterações nos genes moduladores - FVL e PRT 20210 G/A do gene da protrombina está assinalada na Tabela 10. O propósito PCVIII é heterozigótico para FVL; os indivíduos PCXI e PCXIb são heterozigóticos para PRT 20210G/A; e o familiar PCVIIIa é simultaneamente heterozigótico para o FVL e PRT 20210G/A.

1. Prevalência dos polimorfismos -1654C>T, -1641A>G e -1479A>T do promotor do gene *PROC*

Na Tabela 11 são apresentadas as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos -1654C>T, -1641A>G e -1479A>T dos indivíduos estudados relativamente à população-controlo, anteriormente referida. (84)

Tabela 11. Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos -1654 C>T, -1641A>G, -1479 A>T do promotor do gene *PROC* (população estudada relativamente à população-controlo (83)).

-1654 C>T	nM/C	Freq.gen.(%)	-1641 A>G	nM/C	Freq. gen.(%)	-1479 A>T	nM/C	Freq. gen. (%)
CC	18/21	69.2/40.4	AA	8/20	30.8/38.5	AA	8/21	30.8/40.4
CT	7/23	26.9/44.2	AG	12/22	46.1/42.3	AT	12/22	46.1/42.3
TT	1/8	3.9/15.4	GG	6/10	23.1/19.2	TT	6/9	23.1/17.3
f.alélic. T		17/37	freq.alélic. G		46/40	freq.alélic. T		46/37
f.alélic. C	(%)	83/63	freq.alélic. A	(%)	54/60	freq.alélic. A	(%)	54/63

nM/C: número de indivíduos com mutação no gene *PROC*/número de indivíduos-controlo; em *itálico* – valores referentes aos indivíduos-controlo; freq. gen (%): frequências genotípicas; f. alélic.: frequência alélica

Apesar de a amostragem ser pequena, as prevalências alélicas estão de acordo com os dados encontrados por Pomp ER *et al* (2009) (83): o alelo C, do -1654C>T é o mais comum nos indivíduos-controlo e naqueles com deficiência de PC, com 83% de expressão neste últimos; no que se refere aos polimorfismos -1641A>G e -1479 A>T, a maioria dos alelos também é *wild-type* para cada população (Tabela 11).

Deste modo, é possível constatar que o haplótipo correspondente, CAA, tem a frequência mais elevada dos 4 haplótipos observados na população de estudo e na população-controlo (CAA; CGT; TAA; TGT). Em outras populações a diversidade genética observada, no que se refere a estes polimorfismos, é maior. (81, 83)

Foram observados apenas 6 genótipos diferentes, sendo o genótipo CC/AG/AT o mais frequente na população de estudo.

Este último está presente em oito indivíduos com níveis médios de antígeno de PC de 58.2%, seguido da combinação genotípica CC/GG/TT, encontrada em 6 indivíduos com uma média de 52.8% de PC. Estes dois genótipos estão presentes em metade (54%) da população estudada (Tabela 12).

Tabela 12. Distribuição da frequência dos genótipos dos polimorfismos no promotor do gene *PROC* e respectivas médias de antígeno e actividade de PC na população estudada.

Genótipo (haplótipo)	nM (%)	PC Ag ¹ (média/ SD)	PC Act ² (média/ SD)
CC/AA/AA (CAA/CAA)	4 (15.4)	63.3±2.1	59±1
CC/AG/AT (CAA/CGT)	8 (30.8)	58.2±13.0	60.8±11.9
CC/GG/TT (CGT/CGT)	6 (23.1)	52.8±7.3	53.5±9.5
CT/AA/AA (CAA/TAA)	3 (11.5)	48.0±9.9	48.3±10
CT/AG/AT (CAA/TGT)	4 (15.4)	43.0±2.3	36.5±0.7
TT/AA/AA (TAA/TAA)	1 (3.9)	51	52

nM: número de indivíduos com mutação no gene *PROC*; PC Ag¹ – níveis de antígeno de PC (72-160%); PC Act² – níveis de actividade de PC (70-140%); SD: desvio padrão

Depois de CAA, o haplótipo CGT revelou-se o mais prevalente, presente em 14 indivíduos, tendo sido encontrado, em homozigotia, em 6, pertencentes a 5 famílias, e todas elas apresentaram a mutação p.R199X.

Os haplótipos TGT e TAA apresentam a frequência alélica mais baixa, ocorrendo cada um em 4 indivíduos. Este último foi encontrado, em homozigotia, em apenas um propósito, que apresenta a mutação reguladora no promotor do gene *PROC*, g.-13A>G (Tabela 13).

Como foi referido, pela análise estatística da população-controlo, existe uma diferença estatisticamente significativa ($p=0.0375$) entre as médias de actividade de PC dos indivíduos com os haplótipos CGT e TAA em homozigotia, o que corrobora os estudos de Scopes D *et al* (1995) (82) e Aiach M *et al* (1999) (66). Na população deste estudo não é possível inferir esta diferença, uma vez que o número de indivíduos é muito reduzido.

No entanto, comparou-se o fenótipo dos indivíduos onde se encontraram estes haplótipos em homozigotia, uma vez que, segundo Spek *et al* (1995) (37), os indivíduos com o

haplótipo CGT revelam um risco trombótico mais elevado, relativamente aos que apresentam o haplótipo TAA, conferindo este último um efeito protector.

Tabela 13. Haplótipos CGT e TAA em homozigotia em indivíduos com determinadas mutações.

Haplótipo HMZ	Indivíduo/Família (n)	PC Ag ¹ (média)	PC Act ² (média)	Mutações
CGT	6/5	52.8	53.5	p.R199X
TAA	1/1	51	52	g.-13 A>G

HMZ-homozigotia; PC Ag¹ – antígeno PC (72-160%); PC Act² – actividade PC (70-140%)

2. Caracterização das mutações no gene *PROC*

A caracterização das mutações identificadas no gene *PROC* é apresentada e discutida nas páginas seguintes. Na Figura 9 estão representados os electroferogramas, obtidos pelo *Seqscape*®, correspondentes às mutações e aos polimorfismos do promotor.

A análise das mutações *versus* níveis de PC *versus* fenótipo – está representada na Tabela 14.

2.1. Mutação reguladora no promotor: -13 A>G

É uma mutação pontual caracterizada pela substituição de uma adenina por uma guanina, -13A>G (AAA>GATATTT) (Figura 9), e situa-se no *core* da região promotora do gene *PROC*, próximo do local do início da transcrição. Esta alteração afecta os locais de ligação, parcialmente sobrepostos (*sense* e *antisense*), do factor de transcrição hepático, HNF-3, abolindo por completo a respectiva transactivação da região promotora (85). Desta forma, a -13A>G reduz significativamente a actividade do promotor do gene *PROC* como referido por Millar DS *et al.* que previram uma diminuição da actividade da região promotora a 12±3% do normal. (86)

Nas proximidades da mutação -13A>G foram descritas outras mutações que diminuem a actividade do promotor, dando também origem a deficiência quantitativa de PC, Estas mutações ocorrem numa região conservada em várias espécies de primatas e murinos. (35)

Esta mutação reguladora está presente nos *proposita* PCI e PCII, que apresentam níveis médios de actividade e antígeno de 45% e 46%, respectivamente.

O propósito PCI, que apresenta TFr (aos 35, 39 e 44 anos de idade), associa a mutação -13 A>G a 38% de actividade de PC, enquanto que o PCII possui 52% de proteína funcional. Este indivíduo foi estudado no âmbito de um estudo familiar por défice de PC, não manifestando trombose venosa apesar da toma de anticoncepcionais orais, como factor de risco adicional (Tabela 8).

A ligeira diferença dos valores de PC nos dois *proposita*, poderá ser explicada pela presença do haplótipo TAA em homozigotia no indivíduo PCII. Alguns autores referem que este haplótipo em homozigotia não só confere os níveis mais altos de PC como protecção para trombose venosa, o que também justificava a ausência de eventos trombóticos; no entanto, esta correlação não é sustentada em todos os estudos. (83)

Num estudo recente na população portuguesa, David D *et al* (2011) (87), encontraram esta mutação em doze indivíduos, com médias de antigénio e actividade (43% e 42%) similares.

2.3. Mutação *nonsense* - p.R199X

A mutação *nonsense* localiza-se no exão 7, ao nível do codão 199, onde ocorre a transição C>T: g.595 C>T (CGA>TGA) (Figura 9). Esta alteração dá origem à substituição de uma arginina por um codão de terminação: p.R199X. Desta forma, é sintetizado um zimogénio truncado: a secreção plasmática é abolida, sendo promovida a degradação da proteína e/ou o mRNA, ainda no meio intracelular. Soria JM *et al* (1996) (88) defende ainda que, a razão para a PC truncada não existir na circulação se deve à exclusão do alelo mutado, ao nível da transcrição. Pode inferir-se, portanto, que esta mutação em homozigotia poderia causar um fenótipo de purpura fulminante.

O aminoácido suprimido integra o dipeptídeo de ligação L198-R199, que ao ser removido por proteólise, promove a formação das cadeias pesada e leve, unidas posteriormente por uma ponte dissulfídica. O resíduo 199 faz parte de um *cluster* de argininas (105, 199, 187, 310), que cria um *exosite* funcional, ou seja, locais de reconhecimento. (44, 89) No entanto, apesar de ser estruturalmente importante, a R199 não é um aminoácido conservado entre espécies ortólogas. (56)

A mutação *nonsense* R199X foi descrita em várias populações como causa de deficiência de PC tipo I. No entanto, mesmo local, a mutação *missense* R199Q foi associada a deficiência qualitativa. (90, 91) O facto de a R199 corresponder a um codão onde se situa o dinucleótido CG, indica que alterações neste local possam ser frequentes.

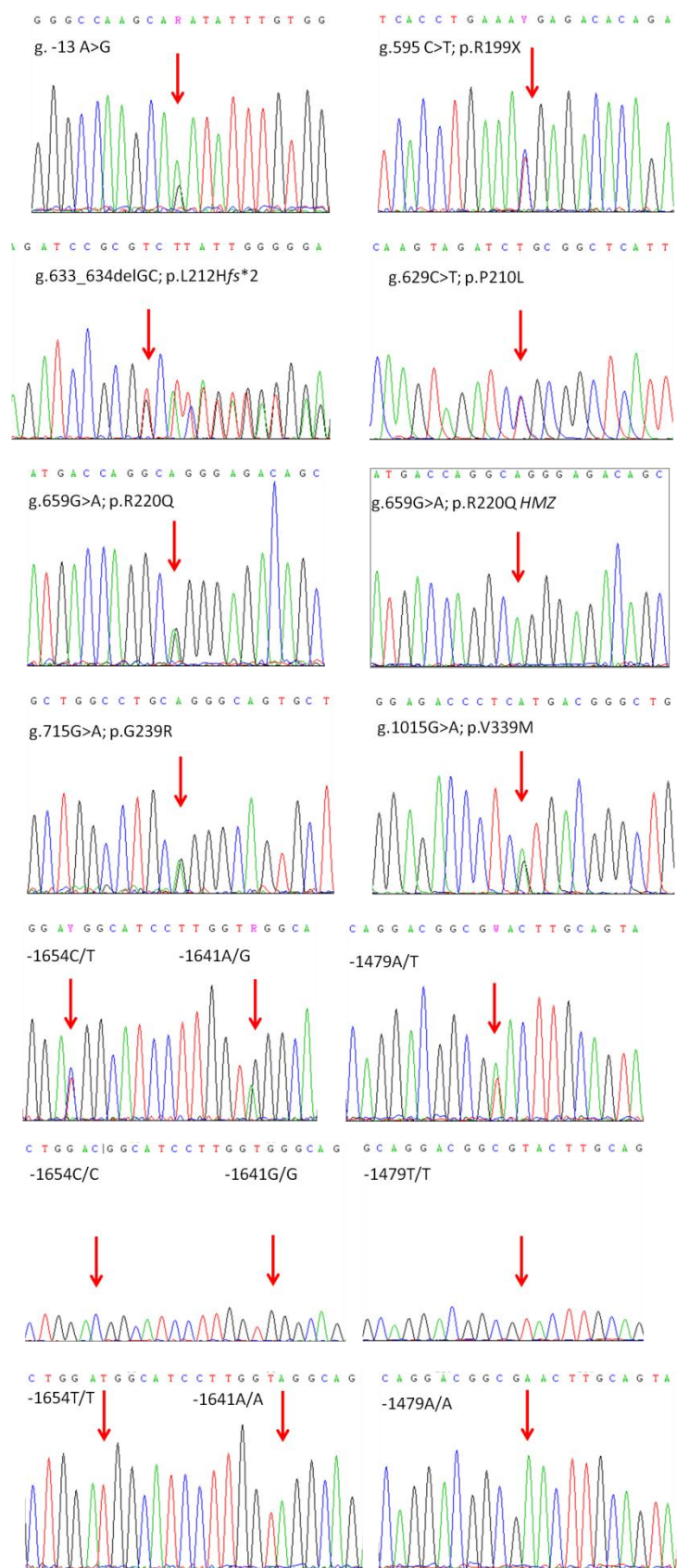


Figura 9. Representação dos electroferogramas (Sepscape®) das mutações identificadas no gene *PROC*, e dos genótipos CC/AG/AT, CC/GG/TT e TT/AA/AA correspondentes aos polimorfismos -1654C>T, -1641A>G e -1479A>T do promotor. HMZ – homozigotia. A nomenclatura usada é sugerida pela HGVS (38).

A mutação *nonsense* R199X revelou-se a alteração no gene *PROC* mais frequente deste estudo, tendo sido identificada em nove indivíduos, cujos valores funcionais estão compreendidos entre 40 e 66%: PCIII (2); PCIV (1); PCV (2); PCVI (1); PCVII (1), PCVIII (2).

Não foram obtidos os valores basais de PC correspondentes ao propósito PCIII, antes de ser submetido a terapêutica de anticoagulação oral, imediatamente após a ocorrência do episódio de TEP. O propósito PCIV apresenta história de morte fetal com recorrência, às 34 e 30 semanas de duas gestações, com informação de trombose placentar, sendo o primeiro aborto aos 32 anos de idade.

O propósito PCV desenvolveu TFr ocorrendo a primeira aos 21 anos, sem haver referência a factores de risco circunstanciais; o propósito PCVI desenvolveu TVP aos 19 anos, seguida de TEP, tendo como factor de risco adquirido o uso de pílula; o propósito PCVII desenvolveu TVP aos 33 anos, seguida de cavernoma da veia porta; o propósito PCVIII desenvolveu TVP aos 34 anos, no puerpério, sendo também portador de heterozigotia para o FVL.

Os familiares PCIIIa, PCVa e PCVIIIa apesar dos níveis de PC diminuídos não desenvolveram trombozes. De salientar que, o familiar PCVIIIa, além da heterozigotia para esta mutação apresentava heterozigotia para o FVL e PRT G20210A tendo sido sujeito a cirurgia a uma hérnia discal.

Estes dados sugerem que nem sempre existe uma relação imediata genótipo-fenótipo, mesmo quando há presença de factores de risco, quer genéticos, quer adquiridos. Estes casos deixam prever que, provavelmente, estes indivíduos possam ter modulação de outros genes que equilibrem o sistema hemostático.

Curiosamente, algumas destas famílias apresentam o haplótipo CGT em homozigotia, relativo aos polimorfismos na região promotora, associado a níveis antigénicos de PC mais baixos. Os indivíduos PCIII, PCIIIa, PCIV, PCV, PCVII e PCVIII são homozigóticos para este haplótipo, no entanto, não se verifica um decréscimo dos níveis de PC relativamente aos indivíduos em que o haplótipo aparece em heterozigotia. Isto deve-se, provavelmente, ao facto de que, esta mutação em heterozigotia, ao conferir um alelo nulo, em indivíduos heterozigóticos para CGT, poderá provocar o mesmo efeito do haplótipo em homozigotia.

David D *et al* (2011) (87) desenvolveram a análise de haplótipos entre os membros das famílias afectadas pela R199X, e concluiu que provavelmente houve um efeito fundador que a introduziu na população portuguesa. Nesse estudo, cinco indivíduos pertencentes a duas famílias apresentaram esta mutação com níveis médios de actividade de PC de 37.5% e 47.5%, respectivamente. Por outro lado, Dávid M *et al* (2000) (92) identificou apenas um

indivíduo com R199X, numa amostra de quinze famílias inglesas, cuja actividade de PC foi de 39%.

2.2. Pequena deleção - p.L212Hfs*2

Situa-se no exão 7, e é caracterizada pela perda de dois nucleótidos - GC - pertencentes aos codões 211 e 212, respectivamente: g.633_634delGC (CGG...CTC ATT GAT>CGT CAT TGA) (Figura 9). Deste modo, a pequena deleção vai abolir o local de reconhecimento do complexo T/TM (conservado entre espécies ortólogas), responsável pela proteólise do peptídeo de activação, e consequentemente, pela activação do zimogénio. Neste local, o aminoácido 211 (R) mantém-se, no entanto, no codão 212 existe a troca de uma leucina por uma histidina. No codão seguinte à deleção (213) é introduzido um codão de terminação prematuro (TGA), dando origem a uma mutação *frameshift*: p.Leu212Hisfs*2. É sintetizado um zimogénio truncado impedido de ser activado, o que estimula a sua degradação.

Esta mutação p.Leu212Hisfs*2 foi detectada na família PCX, em dois membros, com níveis de actividade de PC - 36% e 49%, e os de antigénio 45% e 55%, respectivamente. Apenas o propósito sofreu trombose venosa, contando três episódios: TVP aos 19, e TFr aos 21 e 22 anos de idade.

A deleção p.Leu212Hisfs*2 foi descrita pela primeira vez, em 2011, num estudo português, por David D *et al.* (87) Foi encontrada em dois indivíduos com défice quantitativo, com uma média de actividade de 26%, e 36.5% de antigénio. De um modo semelhante, a média das idades da ocorrência dos eventos trombóticos é de 22 anos, sendo das mais precoces entre os indivíduos estudados.

Das alterações descritas no gene *PROC*, as deleções não são as mais comuns. A mutação p.L212Hfs*2 encontrada ainda apenas na população portuguesa poderá ter uma origem ancestral comum. No entanto, esta afirmação carece de estudos mais extensos.

Pelo facto de se situar no local chave da activação da PC, prevê-se que a p.Leu212Hisfs*2 em homozigotia fosse incompatível com a vida. No entanto, apesar de, teoricamente, as mutações neste local comprometerem em definitivo a formação de APC, ainda não se conhecem estudos que o comprovem.

Foram descritas outras mutações neste local, como a substituição da arginina 211 por um glutamato (R211E) ou por um triptofano (R211W). (91, 93) Esta última mutação foi encontrada em homozigotia, por Millar D *et al* (2000) (94), em um propósito com níveis de PC de 1%, tendo manifestado púrpura fulminante neonatal. Os pais, sendo heterozigóticos,

possuíam níveis de 50% de actividade/antigénio. Esta mutação foi associada também a défice de PC tipo II, em povos asiáticos, onde é relativamente comum, com uma prevalência de cerca de 10% na população japonesa. (95-97)

A recorrência de mutações neste local pode dever-se à presença do dinucleótido CG, e por se tratar de um aminoácido altamente conservado. (98)

2.4. Mutações *missense* – p.P210L; p.R220Q; G239R; V339M

Foram identificadas quatro mutações *missense* (g.629C>T; g.659G>A, g.715G>A, g.1015G>A) (Figura 9) em quatro famílias num total de treze indivíduos.

A primeira foi encontrada em 4 indivíduos da família PCIX. A g.629C>T (CCG>CTG) situa-se no exão 7 e, caracteriza-se pela substituição de um resíduo de prolina por uma leucina, no codão 210: p.P210L. Deste modo afecta o peptídeo de activação, num local adjacente ao sítio onde o complexo T/TM reconhece um local de clivagem (codão 211).

A média de actividade de PC nos indivíduos afectados é de 65.3%, tendo sido registados valores de 57 a 73%.

A mutação g.659G>A (CGG>CAG) afecta a família PCXI, com cinco indivíduos. O familiar PCXIc, como já foi referido, apresenta a mutação em homozigotia.

A mutação g.659G>A está também situada no exão 7, no local correspondente ao início do domínio serina-protease. No codão 220 ocorre a troca de um resíduo de arginina por uma glutamina: p.R220Q.

A média da PC funcional nestes indivíduos é de 59.8%, embora os níveis oscilem entre os 19% e os 64%. O valor mais baixo corresponde ao membro homozigótico para a mutação, e não foi contabilizado para a média de actividade de PC correspondente à mutação em causa.

A mutação g.715G>A (GGG>AGG) foi encontrada apenas em um indivíduo (PCXII). Situa-se no exão 8, ao nível do codão 239, com a substituição de um aminoácido de glicina por uma arginina: p.G239R. Está adjacente a uma ponte dissulfídica, e relativamente próximo de um dos locais da tríade catalítica, His253. A determinação da PC neste indivíduo revelou um valor *borderline* de actividade: 60%.

Por último, os 3 indivíduos da família PCXIII, apresentam a mutação g.1015G>A (GTG>ATG). Localizada no exão 9, é caracterizada pela permuta de um resíduo de valina por uma metionina, no codão 339: V339M. O codão afectado, no domínio serina-protease, situa-se entre duas pontes dissulfídicas; uma delas liga as cadeias leve e pesada da PC.

Esta família manifesta, em média, 42,3% de antígeno de PC, oscilando entre 41 e 45%. A actividade foi apenas determinada num indivíduo familiar, com 37% de proteína funcional.

Todas as mutações ocorrem com a transição G>A, excepto a g.629C>T (p.P210L) que surge pela transição de C>T. Estão situadas em dinucleótidos CG, locais onde ocorrem mutações frequentemente.

2.4.1. Modelação molecular e relação fenotípica

A avaliação predictiva do possível impacto que a troca de aminoácido pode provocar na estrutura e função da PC, levada a cabo pelas ferramentas de modelação molecular *in silico* SIFT e Polyphen, está sumarizada na Tabela 15. (75, 76)

A análise de cada programa foi comparada com o objectivo de classificar, por critérios distintos, mas complementares, as mutações *missense*, e assim prever a “severidade” do fenótipo consequente.

Obteve-se concordância de resultados na avaliação de todas as mutações *missense*.

2.4.1.1. p.P210L

O aminoácido prolina 210 faz parte do peptídeo de doze aminoácidos (Asp200-Arg211) que sofrem proteólise pelo complexo T/TM, dando origem à activação do zimogénico. É considerado um aminoácido conservado na PC de algumas espécies ortólogas (Tabela 15). (93)

As prolinas, além de possuírem propriedades hidrofóbicas, afectam a estrutura secundária da cadeia polipeptídica, por quebrarem α -hélices ou β -sheets. (99)

A mutação em que ocorre a substituição da prolina 210 por uma leucina, é caracterizada por ser “tolerante”, pela análise *in silico* do programa SIFT, e “benign” pelo Polyphen (Tabela 15). A substituição não afecta a hidrofobicidade, nem a polaridade, uma vez que são ambos aminoácidos sem carga. Apesar disso, dada a sua localização no peptídeo de activação, a sua substituição pode vir a comprometer a secreção e estabilidade do zimogénico. (87)

Tabela 14. Relação entre as mutações identificadas no gene *PROC* e as manifestações fenotípicas.

<i>Tipo Mutação</i>	<i>Região</i>	<i>Nucleótido</i>	<i>Alteração AA</i>	<i>Local ligação/Domínio</i>	<i>PC Act¹ (%)</i>		<i>n famílias afectadas</i>	<i>nM/nM+T</i>
					<i>Média</i>	<i>Intervalo</i>		
Reguladora	Promotor	-13A>G (-1533A>G)	-	<i>Factor transcrição-HFN3</i>	45	38-52	2	2/1
Pequena Deleção	Exão 7	g.633_634delGC	p.Leu212Hisfs*2 (170)	Peptídeo activação	42.5	36-49	1	2/1
Nonsense	Exão 7	c.595C>T	p.Arg199X (157)	Dipeptídeo de ligação	50.5	40-66	6	9/6
Missense	Exão 7	c.629C>T	p.Pro210Leu (168)	Peptídeo activação	65.3	57-73	1	4/1
	Exão 7	c.659G>A	p.Arg220Gln (178)	Serina-protease	59.8	(19♦)58-64	1	5/2
	Exão 8	c.715G>A	p.Gly239Arg (197)	Serina-protease	60	60	1	1/1
	Exão 9	c.1015G>A	p.Val339Met (297)	Serina-protease	37	37	1	3/1

PC Act¹ - actividade PC (70-140%); Intervalo – o valor de actividade de PC mais elevado e o mais baixo que se obtiveram nos indivíduos afectados; nM/nM+T – o número de indivíduos afectados pela mutação relativamente ao número de indivíduos com a mutação, e com história pessoal de tromboembolismo; ♦-indivíduo homozigótico. A numeração usada é sugerida pela HGVS (38), com referência, em *itálico*, à numeração segundo Foster *et al* (1985) (37).

A P210L foi descrita na população francesa, em heterozigotia e homozigotia (doente com níveis de PC de 15%), como uma mutação recorrente, causando deficiência de PC tipo I. (99) Os coreanos Kim H- J *et al* (2008) (100) apresentaram um propósito com deficiência tipo I por heterozigotia composta, em que uma das mutações era a P210L e a outra R211W. Apesar disso, este apenas desenvolveu os primeiros episódios trombóticos aos 19 anos, na sequência de trauma. A mãe deste, heterozigótica para a P210L, tem como história clínica TF superficial, aos 38 anos.

Estes dados sugerem que a P210L parece conferir um baixo grau de trombogenicidade, o que pode explicar o facto de as manifestações fenotípicas ocorrerem tão tardiamente no propósito do estudo coreano (actividade 4% e antigénio 13%).

Na população portuguesa, David D *et al* (2011) (87) identificou-a em um indivíduo com 68% de actividade de PC, com história pessoal de trombose aos 44 anos.

No presente estudo, a média dos níveis de PC é de 65.3%, próxima do limite mínimo de normalidade. Dos quatro indivíduos (família PCIX) que a manifestam, apenas o propósito sofreu trombose venosa, aos 26 anos de idade, na sequência de um período de imobilização em viagem de 36 horas. Este indivíduo, do sexo feminino, ainda tinha como factor de risco o facto de tomar anticonceptivos orais. Não refere história familiar positiva.

Apesar da localização e conservação do resíduo de prolina na estrutura da PC, os níveis de actividade encontrados e as circunstâncias do evento trombótico parecem indicar que a função da PC não é gravemente comprometida, como foi afirmado anteriormente. No entanto, o reduzido número de indivíduos estudados não permite inferir, com segurança, acerca da relação genótipo/fenótipo.

2.4.1.2. p.R220Q

O aminoácido arginina 220 forma uma ponte salina com o glutamato 223, através da cadeia básica que possui; está afastado do local catalítico. (45) Não é considerado conservado, quando comparado com as regiões homólogas de outros factores DVK, nem entre espécies ortólogas (bovinos e murinos). Este resíduo insere-se num *cluster* de aminoácidos, R(Arg)G(Gly)D(Asp), que contribuem para a ligação da TM, e consequentemente, para a activação da PC, pelo complexo T/TM. (38, 86) A comprová-lo, Grinnell B *et al* (1994) (101), ao manter TM em contacto com PC mutada, neste local, não obteve estímulo à activação desta última.

A arginina 220 está localizada na cadeia pesada, num *loop*, a 20 resíduos de distância do dipeptídeo de ligação, que é removido por clivagem, dando origem a uma proteína de duas cadeias.

A mutação p.R220Q provoca a mudança de um aminoácido pesado com carga fortemente positiva, como a arginina, para uma glutamina, que é um resíduo neutro (Figura 9).

A presença de uma glutamina, na posição 220, não cria interações adversas nos resíduos circundantes, embora seja um aminoácido com tendência para formar estruturas secundárias. No entanto, a ligação com o ácido glutâmico 223 não existirá, o que compromete o *folding* estável da PC. Tem-se ainda especulado que a presença da glutamina altera a conformação local, levando à remoção do peptídeo de ligação durante o processo translacional, o que compromete o transporte intracelular e a degradação da molécula mutada, mediada pelo retículo endoplasmático. Neste caso, a proteína mutada é encaminhada para o citoplasma, onde possivelmente será degradada por proteossomas. (102)

Dadas estas características, a R220Q não é considerada uma mutação com consequências muito severas, daí que os programas preditivos a considerem *Tolerant* (SIFT) ou *Benign* (Polyphen) (Tabela 15).

Nos inúmeros estudos onde foi identificada, está associada a deficiência de PC tipo I. Na população francesa, Gandrille S *et al* (1995) (99) referem-na como a mutação mais frequente, presente em oito famílias de um estudo (níveis desconhecidos). Um estudo inglês também refere esta alteração em um indivíduo com 33% de actividade de PC. (86) Na população espanhola, Soria JM *et al* (1996) (103), estudam a recorrência/efeito fundador em doentes com deficiência tipo I. David D *et al* (2011) (87) referem, na população portuguesa, nove indivíduos com média de actividade compreendida entre 14 e 58%, em que o de níveis mais baixos é homozigótico para a p.R220Q.

Na mesma posição, 220, ocorrem também frequentemente a substituição por outros resíduos, como a glicina (87) e o triptofano. (99, 104)

A actividade de PC, nos quatro indivíduos heterozigóticos deste estudo (família PCXI), oscila entre os 58 e 64%, com uma média de 59.8%. O propósito desenvolveu TVP, aos 46 anos de idade, mesmo possuindo, em heterozigotia, a PRT G20210A. Como factores de risco adquiridos, somam a cirurgia a varizes, obesidade, e sedentarismo. O PCXIId manifestou um episódio de TF (informação não mostrada), e é o único familiar deste estudo com antecedentes de trombose venosa (Tabela 10). Desconhece-se se apresentava factores de risco adquiridos.

Um dos familiares, com 64% de actividade, é também heterozigótico para a PRT G20210A, mas ainda não desenvolveu trombose.

O indivíduo homozigótico, do sexo feminino, aos 23 anos de idade, revela 19% de proteína funcional, e não manifestou clínica. Apesar de a homozigotia na deficiência de PC estar associada a purpura fulminante, no período neonatal, estão descritas deficiências que em homozigotia têm um fenótipo ligeiro, com os primeiros eventos trombóticos em idade adulta, e desencadeados por factores de risco adquiridos. (94)

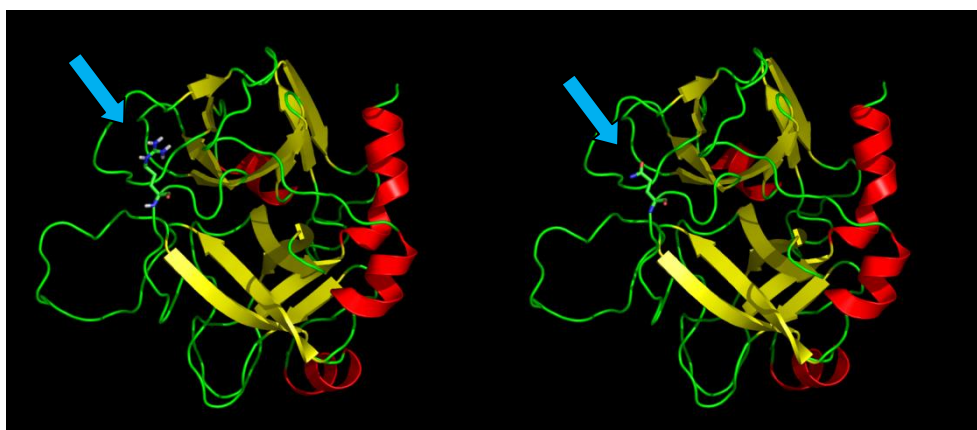


Figura 10. R220Q: (à esquerda) estrutura da cadeia pesada da PC com o aminoácido nativo arginina (R) na posição 220; (à direita) posição 220 com o aminoácido glutamina (Q). A seta azul indica o local da substituição. (adaptado de <http://www.itb.cnr.it/procmd/index.html> (55))

2.4.1.3. p.G239R

A glicina do codão 239 é considerada um aminoácido altamente conservado na PC entre espécies de mamíferos, e em outras proteínas DVK, como os factores II, VII, IX e X, o que comprova a sua importância estrutural. A ocorrência de mutações que afectem esta posição provoca alterações na cadeia polipeptídica, uma vez que entre o aminoácido *wild-type* e o mutado existe uma diferença de tamanho considerável. (99) As glicinas caracterizam-se por serem os aminoácidos com menor massa; não possuem carga, e têm a capacidade de quebrar estruturas secundárias. A Gly239 localiza-se na cadeia pesada, no terminal-N de uma β -barrel, no domínio catalítico serina-protease da PC. É um aminoácido interno que estabelece uma ligação por pontes de hidrogénio com a cadeia principal da serina 402, um dos resíduos da tríade catalítica, ajudando a manter a geometria própria do local activo. (56)

Tabela 15. Mutações *missense* – classificação pelos programas preditivos *Polyphen* e *SIFT*.

Exão	Local proteico afectado	Alteração nucleotídica	Alteração aminoácido	PC Act ¹ (média)	nM/nM+T	Alinhamento múltiplo (55) (H/P/M/C ²)	SIFT (74) (PSI-BLAST)	PolyPhen (75) (PSIC-score difference)	Modulação molecular/consequência na proteína
7	Adjacente sítio activação	c.629C>T	p.Pro210Leu (168)	65.3	4/1	P/P/P/P	<i>Tolerant</i> (0.09)	<i>Benign</i> (0.256)	Alteração da estrutura secundária; secreção e estabilidade reduzidas
7	Cluster aa ligação TM	c.659G>A	p.Arg220Gln (178)	59.8	5/2	R/W/Q/R	<i>Tolerant</i> (0.58)	<i>Benign</i> (0.019)	Alteração da polaridade; retenção intracelular e degradação
8	Tríade catalítica	c.715G>A	p.Gly239Arg (197)	60.0	1/1	G/G/G/G	<i>Deleterious</i> (0.00)	<i>Probably damaging</i> (1.000)	Alteração electroestática no local activo Ser402; comprometimento actividade catalítica
9	Tríade catalítica	c.1015G>A	p.Val339Met (297)	37.0	3/1	V/V/V/V	<i>Deleterious</i> (0.00)	<i>Probably damaging</i> (0.986)	Perda/ganho de ligações hidrofóbicas; comprometimento na estabilidade e secreção

PC Act¹ - actividade PC (70-140%); nM/nM+T – o número de indivíduos afectados pela mutação relativamente ao número de indivíduos com a mutação, e com história pessoal de tromboembolismo; SIFT (PSI-BLAST): se ≤0.05 – *Deleterious*; se ≥0.05 até 1.00 – *Tolerant* (74); PolyPhen (PSIC-score difference): ≤0.5 – *benign*; ≥0.5 – *possibly/probably damaging* (75); H/P/M/C² – Humanos (*Homo sapiens*); porcino (*Sus scrofa*); murinos (*Mus musculus* e *Rattus norvegicus*); canino (*Canis familiaris*) (55); aa – aminoácido; TM - trombomodulina. A nomenclatura usada é sugerida pela HGVS (38), com referência, em *itálico*, à nomenclatura segundo Foster *et al* (1985) (37).

A substituição da glicina por uma arginina, G239R, introduz um radical grande, com carga positiva, e menos hidrofóbico, no interior estreito da proteína (Figura 10). Estas propriedades podem implicar o comprometimento da estrutura protéica e a funcionalidade do local activo da tríade. (57, 76, 93)

Pela análise dos programas *in silico*, a p.G239R é conotada como *Deleterious (SIFT)* e *Probably damaging (Polyphen)* (Tabela 15).

A mutação p.G239R foi descrita pela primeira vez por Ireland H *et al* (1996) (105), num estudo multicêntrico, onde identificaram dois indivíduos com a alteração: o propósito apresentava trombose recorrente, com o primeiro episódio ocorrido aos 18 anos. Não foi possível determinar os níveis de PC, uma vez que este estava sob terapêutica de anticoagulação oral. Gandrille S *et al* (1995) (99) identificaram na população francesa, em quatro famílias, outra alteração neste local, com a substituição da glicina por um glutamato.

A actividade de PC do único indivíduo afectado (propósito PCXII), no presente estudo, é de 60%, e o antígeno de 64%; manifestou TF e TVP, tardiamente aos 56 e 57 anos de idade. Neste caso, embora apresente níveis *borderline*, foi efectuado o estudo molecular, uma vez que o propósito faz parte de uma família numerosa (a qual não foi possível estudar) com histórico de trombose venosa, inclusivamente, com a ocorrência de três nados-mortos, em indivíduos com deficiência de PC. Desconhece-se se a família possui outra mutação no gene PROC, ou se existem outros genes reguladores, do sistema da PC ou outros *loci*, que possam regular os níveis de PC. O facto de este indivíduo possuir uma mutação no domínio catalítico, apresenta uma proteína funcional, cujo valor está próximo do limite mínimo da normalidade.

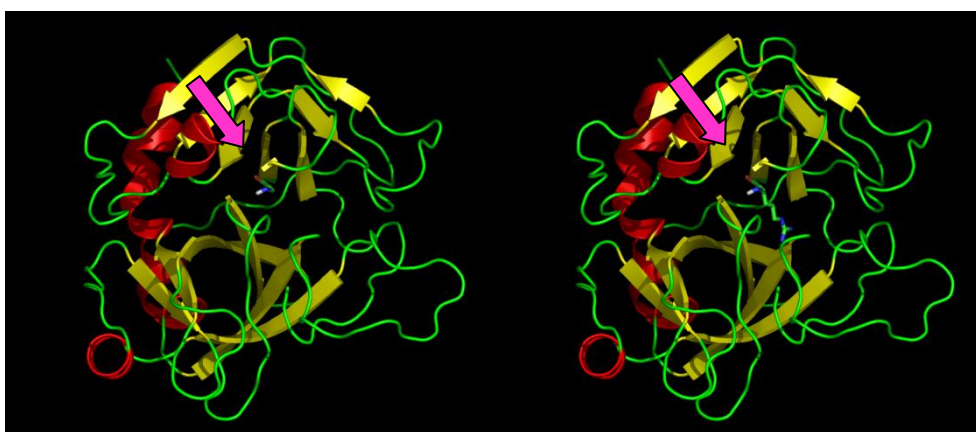


Figura 11. G239R: (à esquerda) estrutura da cadeia pesada da proteína C como o aminoácido nativo glicina (G) na posição 239; (à direita) posição 239 com o aminoácido arginina (R). A seta rosa indica o local da substituição. (adaptado de <http://www.itb.cnr.it/procmd/index.html> (55))

2.4.1.4. p.V339M

A valina 339 é um resíduo pequeno, altamente conservado na PC das espécies ortólogas, o que prediz a sua importância na estrutura da proteína. Situa-se no interior de um *core* de aminoácidos hidrofóbicos, na cadeia pesada, e inserida numa β -strand do domínio serina-protease.

A substituição da valina 339 por uma metionina (p.V339M) não provoca alterações na polaridade nem na hidrofobicidade, no entanto, são perdidas as pontes de hidrogénio entre alguns aminoácidos distantes, ganhando-as com outros, como Leu 212 (adjacente ao local de clivagem do complexo T/TM). A metionina compromete as reacções com os aminoácidos circundantes, provocando o fenómeno de *steric hindrance*, uma vez que possui um tamanho exagerado. (56, 93) Deste modo, induz o *misfolding* e provoca grande instabilidade na PC, causando distúrbios na orientação da tríade catalítica. A deficiência tipo I associada a esta mutação será, portanto, devida ao comprometimento estrutural, o que tem como consequência o favorecimento da degradação intracelular da proteína (Figura 11). (106)

A p.V339M apresenta-se, também, como *Deleterious (SIFT)* e *Probably damaging (Polyphen)* (Tabela 15).

Foi descrita primeiramente por Gandrille S *et al* (1995) (99), em três famílias. Não foram apresentados os níveis de PC correspondentes aos indivíduos afectados.

Dávid M *et al* (2000) (92) refere que a V339M é a mutação *missense* mais frequente na população holandesa, e apresenta oito indivíduos com a média da actividade de 38.3%.

Miyata T *et al* (2009) (95), num estudo japonês de prevalências, reporta quatro indivíduos com actividades compreendidas entre 28 e 77%.

No estudo português de David D *et al* (2011) (87), também foram apresentados dois indivíduos com esta mutação, com uma média de actividade/antigénio de 53/60%. Referem que estaria comprometida a secreção e estabilidade da PC.

Todas as publicações referidas associam-na à deficiência de PC quantitativa.

Neste estudo, foi encontrada em três indivíduos (família PCXIII), dos quais, apenas o propósito tem antecedentes de TVP aos 24 anos de idade, estando sob terapêutica anticoncepcional. A média de actividade de PC é de 37%, e é a mais baixa entre os indivíduos deste estudo.

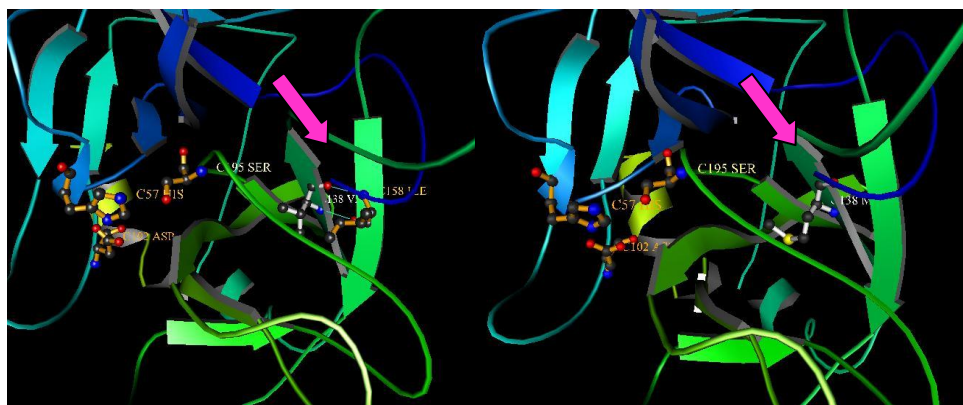


Figura 12. V339M: (*à esquerda*) estrutura da cadeia pesada da PC como o aminoácido nativo valina(V) na posição 339; (*à direita*) posição 339 com o aminoácido metionina (M). A seta rosa indica o local da substituição. (adaptado de <http://www.itb.cnr.it/procmd/index.html> (55))

IV – Conclusão e Perspectivas Futuras

Conclusão

O estudo molecular do gene do *PROC* nas 13 famílias com deficiência de PC revelou-se útil na identificação de portadores entre os indivíduos com níveis sobreponíveis aos normais e/ou *borderline*, e veio confirmar o diagnóstico de deficiência congénita daqueles cujos níveis estão diminuídos. Os estudos familiares revelaram que cinquenta por cento dos indivíduos estudados apresentam uma mutação.

Apesar do número reduzido da amostra de indivíduos, identificaram-se sete mutações diferentes, situadas essencialmente nos exões que codificam domínios da proteína que lhe conferem funcionalidade. Pôde-se constatar que as regiões correspondentes aos exões 7, 8 e 9 são frequentemente afectadas por mutações pontuais, em sequências conservadas entre proteínas DVK, e também entre os genes da PC de espécies ortólogas.

No entanto, o facto de existirem mutações próximas de locais conservados na estrutura da PC, não existe necessariamente uma associação com os níveis de actividade/antigénio muito baixos, ou até a fenótipos clínicos severos. Prova disso foi o facto de ter sido encontrada uma mutação *missense*, adjacente ao local de activação da PC, que confere valores de actividade de 57 e 73%, em que apenas o propósito, com o valor mais baixo, desenvolveu trombose, após imobilização de cerca de trinta e seis horas de viagem, e sob terapêutica de anticonceptivos orais.

A heterogeneidade nos níveis plasmáticos de PC, intra e inter familiar, revela que o estudo funcional da PC é um fraco indicador de manifestação clínica, e de prognóstico. O estudo molecular confirma défices em caso de suspeita, e consoante o tipo e localização da mutação ajuda a inferir o fenótipo. Contudo, os factores de risco adquiridos são, na maioria dos casos, os precipitantes para o evento trombótico.

Embora, a existência do haplótipo CGT em homozigotia, relativo aos polimorfismos, -1654 C/T, -1641 A/G e -1479 A/T, no promotor do gene *PROC*, possa influenciar os níveis de PC, estando associado à diminuição da sua síntese, não parece haver uma relação com a severidade dos eventos trombóticos.

Recentemente foram descritos outros polimorfismos moduladores dos níveis de PC: no gene *PROC* (intrão 1, -141T/C) e no gene do EPCR – *PROCR*. O polimorfismo g.6936A>G, Ser219Gly, no gene *PROCR* está associado ao aumento do EPCR solúvel, que se liga à PC, diminuindo, desta forma, a sua ligação ao EPCR endotelial. A presença deste mecanismo está associada a níveis mais elevados de PC em circulação, e a uma diminuição na capacidade da sua activação. (64, 107)

Por outro lado, os níveis de PC parecem depender da actividade de outros genes, que regulam a transcrição do gene *PROC*. Os estudos de associação *genome wide* (estudos de *linkage*), têm como objectivo, neste caso, identificar no genoma potenciais regiões que estejam envolvidas no controlo da expressão do gene *PROC*, e que, deste modo, possam contribuir para o aumento do risco de trombose venosa. (62, 108)

Um estudo realizado em Espanha correlacionou, em famílias com défice de PC, polimorfismos no gene *NQO1*, que codifica a NAD (P) H-quinona oxidoreductase-1 do metabolismo da vitamina K, com níveis diminuídos de PC. (109)

Além destes polimorfismos que influenciam a expressão do gene *PROC*, a co-ocorrência das variantes dos genes moduladores de fenótipo FVL e PRT G20210A reforça o carácter multigénico, além de multifactorial, da trombose venosa. Sendo assim, a hereditariedade oligogénica pode explicar o elevado risco observado em indivíduos de uma família com história positiva.

A gravidade das deficiências congénitas de PC depende do tipo e local da mutação no gene *PROC*. Foram descritos casos severos em homozigotia, incompatíveis com a vida ou dando origem a episódios tromboembólicos a partir do período neonatal, manifestando-se frequentemente como purpura fulminante. No entanto, tem sido observado em indivíduos homozigóticos ou heterozigóticos compostos, um atraso na ocorrência de trombose, que muitas vezes apenas se manifesta na idade adulta, e em alguns casos, moderadamente severa. (110) Um dos indivíduos estudados, o familiar PCXIc, apresentou a mutação em homozigotia, com actividade de PC de 19%, e aos 23 anos de idade ainda não sofreu nenhum episódio trombótico. Pode concluir-se, neste caso, que a mutação em causa não afecta gravemente a PC, e ainda permite que haja produção de APC funcional, uma vez que os níveis de actividade são comparáveis ao de indivíduos heterozigóticos.

A identificação de mutações no gene *PROC* não tem valor prognóstico, no que diz respeito ao risco de ocorrer trombose. No entanto, se fôr efectuada no âmbito de estudos familiares, em que já haja probabilidade de manifestações trombóticas, a identificação de portadores pode ser útil para decidir profilaxia em situações de risco.

Por outro lado, permite distinguir uma deficiência congénita de um défice adquirido, especialmente nos indivíduos anticoagulados, e naqueles em que não é possível a realização de estudos familiares. E, por fim, ainda possibilita o diagnóstico pré-natal a casais em risco.

O estudo molecular de alterações no gene *PROC*, e o seu efeito, é também muito importante na medida em que contribui para o esclarecimento da estrutura e funções da PC.

Perspectivas futuras

Dos indivíduos heterozigóticos com deficiência de PC, a maioria é assintomática, no entanto, no âmbito de estudos familiares, seria relevante proceder ao estudo de uma amostra mais representativa da população portuguesa.

Sabe-se que em cerca de 10 a 30% dos casos não é encontrada nenhuma mutação que explique o défice de PC. (111) Nesta situação seria importante recorrer a técnicas como o MLPA (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*), para análise do gene *PROC*, úteis na identificação de grandes deleções, inserções e rearranjos.

Seria útil, correlacionar os níveis de PC *versus* mutações no gene *PROC* usando testes funcionais com várias metodologias. A identificação e compreensão do efeito das mutações no gene poderá ajudar a otimizar novos testes mais sensíveis para a detecção de determinado défice.

Em suma, melhorar o conhecimento da função da PC, quando diminuída, como factor de risco para trombose, e tornar a identificação de portadores de mutações no gene *PROC*, um estudo complementar de rotina nos laboratórios de diagnóstico.

V- Referências bibliográficas

1. Laffan M, Manning R. Investigation of haemostasis. In: Lewis SM, Bain BJ, Bates I, (eds). *Dacie and Lewis: Practical Haematology*. 10th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2006; 380-5.
2. Dahlback B. Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders. *Blood* 2008 Jul 1;112(1):19-27.
3. Pike RN, Buckle AM, et int Church FC. Control of the coagulation system by serpins. Getting by with a little help from glycosaminoglycans. *FEBS J* 2005 Oct;272(19):4842-51.
4. Esmon CT. The protein C pathway. *Chest* 2003 Sep;124(3 Suppl):26S-32S.
5. Hoffbrand AV, Petit JE, Moss PAH. Thrombosis and antithrombotic therapy. In: *Essential Haematology*. Fourth ed. Oxford: Blackwell Science; 1993; 273-81.
6. Roberts HR, Tabares AH. Overview of the coagulation reactions. In: High KA, Roberts HR (eds.). *Molecular Basis of Thrombosis and Haemostasis*. New York: Marcel Dekker, Inc.; 1995; 35-50
7. Franco RF, Reitsma PH. Genetic risk factors of venous thrombosis. *Hum Genet* 2001 Oct;109(4):369-84.
8. Lowe GD. Common risk factors for both arterial and venous thrombosis. *Br J Haematol* 2008 Mar;140(5):488-95.
9. Egeberg O. Inherited Antithrombin Deficiency Causing Thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh* 1965 Jun 15;13:516-30.
10. Griffin JH, Evatt B, et int, Wideman C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest* 1981 Nov;68(5):1370-3.
11. Schwarz HP, Fischer M, et int, Griffin JH. Plasma protein S deficiency in familial thrombotic disease. *Blood* 1984 Dec;64(6):1297-300.
12. De Stefano V, Martinelli I, et int, Leone G. The risk of recurrent deep venous thrombosis among heterozygous carriers of both factor V Leiden and the G20210A prothrombin mutation. *N Engl J Med* 1999 Sep 9;341(11):801-6.
13. Baglin T, Gray E, et int, Watson H. Clinical guidelines for testing for heritable thrombophilia. *British Journal of Haematology* 2010;149(2):209-20.
14. Fidalgo TJS. Factores de risco genético para doença tromboembólica - Factor V Leiden, Metilenotetrahidrofolato redutase C677T e variante de Protrombina G20210A. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra; Coimbra, 1998.
15. Rosendaal FR. Venous thrombosis: the role of genes, environment, and behavior. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005:1-12.
16. Tripodi A. A review of the clinical and diagnostic utility of laboratory tests for the detection of congenital thrombophilia. *Semin Thromb Hemost* 2005 Feb;31(1):25-32.
17. Walker ID, Jennings I. Dilemmas in heritable thrombophilia testing. In: Kitchen S, Olson JD, Preston FE, (eds.). *Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis*. First ed. Oxford: Wiley-Blackwell 2009; 147-59.
18. Khan S, Dickerman J. Hereditary thrombophilia. *Thrombosis Journal* 2006;4(1):15.
19. Dahlback B. Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases. *J Intern Med* 2005 Mar;257(3):209-23.
20. Griffin JH, Fernandez JA, et int, Mosnier LO. Activated protein C. *J Thromb Haemost* 2007 Jul;5 Suppl 1:73-80.
21. Dahlback B, Villoutreix BO. The anticoagulant protein C pathway. *FEBS Lett* 2005 Jun 13;579(15):3310-6.
22. Dahlback B, Villoutreix BO. Molecular recognition in the protein C anticoagulant pathway. *J Thromb Haemost* 2003 Jul;1(7):1525-34.
23. Gerry AFN. APC Resistance. Chapter 5. In: Tranquilli A, (ed.) *Thrombophilia*. [online] InTech; 2011; 75-96.

24. Dahlback B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Feb 1;90(3):1004-8.
25. Manithody C, Fay PJ, Rezaie AR. Exosite-dependent regulation of factor VIIIa by activated protein C. *Blood* 2003 Jun 15;101(12):4802-7.
26. Cramer TJ, Gale AJ. The anticoagulant function of coagulation factor V. *Thromb Haemost* 2012 Jan;107(1):15-21.
27. Shen L, Dahlback B. Factor V and protein S as synergistic cofactors to activated protein C in degradation of factor VIIIa. *J Biol Chem* 1994 Jul 22;269(29):18735-8.
28. Kembal-Cook G, Tuddenham EGD, McVey JH. Normal Haemostasis. In: Hoffbrand AV, Catovsky D, Tuddenham EGD, (eds.). *Postgraduate Haematology*. 5th ed. London: Blackwell Publishing; 2005; 783-807.
29. Rezaie AR, Cooper ST, et al, Esmon CT. Protein C inhibitor is a potent inhibitor of the thrombin-thrombomodulin complex. *J Biol Chem* 1995 Oct 27;270(43):25336-9.
30. Elisen MG, von dem Borne PA, et al, Meijers JC. Protein C inhibitor acts as a procoagulant by inhibiting the thrombomodulin-induced activation of protein C in human plasma. *Blood* 1998 Mar 1;91(5):1542-7.
31. Pavlova A, Geisen C, et al, Oldenburg J. SNP map of the protein C gene. In: Scharrer I, Scharrer W, (eds.). *34th Hemophilia Symposium*. Heidelberg: Springer, Hamburg; 2003.
32. Suzuki K. Protein C. In: High KA, Roberts HR (eds.). *Molecular basis of thrombosis and hemostasis*. New York: Marcel Dekker, Inc.; 1995; 393-424.
33. Miao CH, Ho WT, et al, Davie EW. Transcriptional regulation of the gene coding for human protein C. *J Biol Chem* 1996 Apr 19;271(16):9587-94.
34. Tsay W, Lee YM, et al, Chen PJ. Characterization of human protein C gene promoter: insights from natural human mutants. *DNA Cell Biol* 1996 Nov;15(11):907-19.
35. Spek CA, Lannoy VJ, et al, Reitsma PH. Type I protein C deficiency caused by disruption of a hepatocyte nuclear factor (HNF)-6/HNF-1 binding site in the human protein C gene promoter. *J Biol Chem* 1998 Apr 24;273(17):10168-73.
36. Spek CA, Bertina RM, Reitsma PH. Identification of evolutionarily invariant sequences in the protein C gene promoter. *J Mol Evol* 1998 Dec;47(6):663-9.
37. Spek CA, Koster T, et al, Reitsma PH. Genotypic variation in the promoter region of the protein C gene is associated with plasma protein C levels and thrombotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995 Feb;15(2):214-8.
38. Foster D, Davie EW. Characterization of a cDNA coding for human protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984 Aug;81(15):4766-70.
39. Human Genome Variation Society (HGVS). [online]; Available from: <http://www.hgvs.org/rec.html>; [Accessed: 10-10-2010].
40. Katsumi A, Kojima T, et al, Saito H. The carboxyl-terminal region of protein C is essential for its secretion. *Blood* 1998 May 15;91(10):3784-91.
41. Ohkubo YZ, Tajkhorshid E. Distinct structural and adhesive roles of Ca²⁺ in membrane binding of blood coagulation factors. *Structure* 2008 Jan;16(1):72-81.
42. Mather T, Oganessyan V, et al, Bode W. The 2.8 Å crystal structure of Gla-domainless activated protein C. *EMBO J* 1996 Dec 16;15(24):6822-31.
43. Perera L, Foley C, et al, Pedersen LG. Modeling zymogen protein C. *Biophys J* 2000 Dec;79(6):2925-43.
44. Fisher CL, Greengard JS, Griffin JH. Models of the serine protease domain of the human antithrombotic plasma factor activated protein C and its zymogen. *Protein Sci* 1994 Apr;3(4):588-99.

45. Wacey AI, Pemberton S, et al, Tuddenham EG. A molecular model of the serine protease domain of activated protein C: application to the study of missense mutations causing protein C deficiency. *Br J Haematol* 1993 Jun;84(2):290-300.
46. Hemostasis & Thrombosis-Faculty of Medicine-Imperial College [online]; Available from: <http://www1.imperial.ac.uk/medicine/about/divisions/is/haemo/coag/>; [Accessed: 16-01-2009].
47. Plutzky J, Hoskins JA, et al, Crabtree GR. Evolution and organization of the human protein C gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986 Feb;83(3):546-50.
48. Miletich J, Sherman L, Broze G, Jr. Absence of thrombosis in subjects with heterozygous protein C deficiency. *N Engl J Med* 1987 Oct 15;317(16):991-6.
49. Tait RC, Walker ID, et al, Bertina RM. Prevalence of protein C deficiency in the healthy population. *Thromb Haemost* 1995 Jan;73(1):87-93.
50. Goldenberg NA, Manco-Johnson MJ. Protein C deficiency. *Haemophilia* 2008 Nov;14(6):1214-21.
51. Schneppenheim R, Greiner L. Thrombosis in infants and children. *Pediatric Consultative Hematology. American Society of Hematology-Hematology*; 2006; 86-96.
52. Chalmers EA. Neonatal thrombosis. *J Clin Pathol* 2000 Jun;53(6):419-23.
53. Williams MD, Chalmers EA, Gibson BE. The investigation and management of neonatal haemostasis and thrombosis. *Br J Haematol* 2002 Nov;119(2):295-309.
54. Middeldorp S. Thrombophilia and pregnancy complications: cause or association? *J Thromb Haemost* 2007;5:276-82.
55. Reitsma PH. Protein C deficiency: summary of the 1995 database update. *Nucleic Acids Res* 1996 Jan 1;24(1):157-9.
56. ProCMD: 3D Protein C Mutations Database. [online]; Available from: <http://www.itb.cnr.it/procmd/index.html>; [Accessed: 10-10-2010].
57. Human Gene Mutation Database-HGMD. [online]; Available from: <http://www.biobase-international.com/>; [Accessed: 10-10-2010].
58. Berezky Z, Kovács K, Muszbek L. Protein C and protein S deficiencies: similarities and differences between two brothers playing in the same game. *Clin Chem Lab Med* 2010;48 Suppl 1:S53-S66.
59. Nakabayashi T, Mizukami K, et al, Koike T. Protein C Sapporo (protein C Glu 25 --> Lys): a heterozygous missense mutation in the Gla domain provides new insight into the interaction between protein C and endothelial protein C receptor. *Thromb Haemost* 2005 Nov;94(5):942-50.
60. España F, Vaya A, et al, Aznar J. Low level of circulating activated protein C is a risk factor for venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2001 Dec;86(6):1368-73.
61. Medina P, Navarro S, et al, España F. Contribution of polymorphisms in the endothelial protein C receptor gene to soluble endothelial protein C receptor and circulating activated protein C levels, and thrombotic risk. *Thromb Haemost* 2004 May;91(5):905-11.
62. Morange PE, Tregouet DA. Lessons from genome-wide association studies in venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 2011 Jul;9 Suppl 1:258-64.
63. Hasstedt SJ, Scott BT, et al, Bovill EG. Genome scan of venous thrombosis in a pedigree with protein C deficiency. *J Thromb Haemost* 2004 Jun;2(6):868-73.
64. Athanasiadis G, Buil A, et al, Soria JM. A genome-wide association study of the Protein C anticoagulant pathway. *PLoS One* 2011;6(12):e29168.
65. Tang W, Basu S, et al, Folsom AR. Genome-wide association study identifies novel loci for plasma levels of protein C: the ARIC study. *Blood* 2010 Dec 2;116(23):5032-6.
66. Aiach M, Nicaud V, et al, Emmerich J. Complex association of protein C gene promoter polymorphism with circulating protein C levels and thrombotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999 Jun;19(6):1573-6.
67. Protein C Hemosil TM- Automated chromogenic assay (Reagent sheet); USA: Instrumentations Laboratory; version R2 - 303530; Dec 2008

68. DG-EIA PC-Quantitative determination of protein C in citrated human plasma (Reagent sheet); Grifols; USA: Corgenix; version 3023491; Apr 2006.
69. Vertebrate Genome Annotation (VEGA) database. April 2012 [online]; Available from: http://vega.sanger.ac.uk/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=OTTHUMG00000131528;r=2:128176003-128186822;t=OTTHUMT00000254385; [Accessed: 10-10-2010].
70. Badenes PM. Detección de nuevas mutaciones en componentes de la vía de la proteína C, asociadas con un mayor riesgo trombótico. Tese de Doutoramento em Biologia. Facultat de Ciències Biològiques- Departamento de Bioquímica i Biologia Molecular - Universitat de Valencia; 2005.
71. Watanabe K, Shibuya A, et int, Hamasaki N. Identification of simultaneous mutation of fibrinogen alpha chain and protein C genes in a Japanese kindred. Br J Haematol 2003 Jan;120(1):101-8.
72. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A 1977 Dec;74(12):5463-7.
73. PROC protein C (inactivator of coagulation factors Va and VIIIa) [Homo sapiens] 3-Jun-2012 [online]; Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=NM_000312; [Accessed: 12-02-2009].
74. den Dunnen JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. Hum Mutat 2000;15(1):7-12.
75. SIFT - Sorting Intolerant from Tolerant. [online]; Available from: <http://sift.jcvi.org/>; <http://sift.bii.a-star.edu.sg/>; [Accessed: 20-04-2011].
76. PolyPhen-2 prediction of functional effects of human nsSNPs.[online]; Available from: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>; [Accessed: 15-02-2012]
77. Ng PC, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. Nucleic Acids Res 2003 Jul 1;31(13):3812-4.
78. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. Nat Protoc 2009;4(7):1073-81.
79. Ramensky V, Bork P, Sunyaev S. Human non-synonymous SNPs: server and survey. Nucleic Acids Res 2002 Sep 1;30(17):3894-900.
80. Protein C [Homo sapiens].[online]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/190334?report=fasta>; [Accessed: 20-01-2009].
81. Spek CA, Poort SR, et int, Reitsma PH. Determination of the allelic and haplotype frequencies of three polymorphisms in the promoter region of the human protein C gene. Blood Coagul Fibrinolysis 1994 Apr;5(2):309-11.
82. Scopes D, Berg LP, et int, Cooper DN. Polymorphic variation in the human protein C (PROC) gene promoter can influence transcriptional efficiency in vitro. Blood Coagul Fibrinolysis 1995 Jun;6(4):317-21.
83. Pomp ER, Doggen CJ, et int, Rosendaal FR. Polymorphisms in the protein C gene as risk factor for venous thrombosis. Thromb Haemost 2009 Jan;101(1):62-7.
84. Oliveira ACS. Avaliação da actividade da proteína C e expressão de CD64 nos neutrófilos como marcadores de diagnóstico precoce na sépsis.Dissertação de Mestrado de Especialização em Hematologia e Imunologia Clínico-Laboratorial, Escola Superior de Tecnologias da Saúde de Coimbra; Coimbra, 2012..
85. Spek CA, Greengard JS, et int, Reitsma PH. Two mutations in the promoter region of the human protein C gene both cause type I protein C deficiency by disruption of two HNF-3 binding sites. J Biol Chem 1995 Oct 13;270(41):24216-21.
86. Millar DS, Bevan D, et int, Cooper DN. Three novel mutations in the protein C (PROC) gene causing venous thrombosis. Blood Coagul Fibrinolysis 1995 Apr;6(2):138-40.
87. David D, Ferreira C, et int, Gago T. Genetic defects in Portuguese families with inherited protein C deficiency. Thromb Res 2011 Sep;128(3):299-302.

88. Soria JM, Berg LP, et al, Sala N. Ectopic transcript analysis indicates that allelic exclusion is an important cause of type I protein C deficiency in patients with nonsense and frameshift mutations in the PROC gene. *Thromb Haemost* 1996 Jun;75(6):870-6.
89. Greengard JS, Fisher CL, et al, Griffin JH. Structural basis for type I and type II deficiencies of antithrombotic plasma protein C: patterns revealed by three-dimensional molecular modelling of mutations of the protease domain. *Proteins* 1994 Apr;18(4):367-80.
90. Nakagawa K, Tsuji H, et al, Nakagawa M. Protein C deficiency found in a patient with acute myocardial infarction: a single base mutation 157 Arg (CGA) to stop codon (TGA). *Int J Hematol* 1994 Dec;60(4):273-80.
91. Poort SR, Pabinger-Fasching I, et al, Bertina RM. Twelve novel and two recurrent mutations in 14 Austrian families with hereditary protein C deficiency. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1993 Apr;4(2):273-80.
92. Dávid M, Losonczy H, et al, Meyer M. Identification of mutations in 15 Hungarian families with hereditary protein C deficiency. *Br J Haematol* 2000 Oct;111(1):129-35.
93. Rovida E, Merati G, et al, Faioni EM. Identification and computationally-based structural interpretation of naturally occurring variants of human protein C. *Hum Mutat* 2007 Apr;28(4):345-55.
94. Millar DS, Johansen B, et al, Cooper DN. Molecular genetic analysis of severe protein C deficiency. *Hum Genet* 2000 Jun;106(6):646-53.
95. Miyata T, Sato Y, et al, Ikeda Y. Prevalence of genetic mutations in protein S, protein C and antithrombin genes in Japanese patients with deep vein thrombosis. *Thromb Res* 2009 May;124(1):14-8.
96. Hoshi S, Hijikata M, et al, Yamaguchi T. Protein C deficiency in a family with thromboembolism and identified gene mutations. *Intern Med* 2007;46(13):997-1003.
97. Song KS, Park YS, et al, Kim HS. Hereditary protein C deficiency with recurrent thrombosis: identification of a missense mutation (C6218T). *J Korean Med Sci* 1998 Apr;13(2):186-90.
98. Reitsma PH. Protein C deficiency: from gene defects to disease. *Thromb Haemost* 1997 Jul;78(1):344-50.
99. Gandrille S, Aiach M. Identification of mutations in 90 of 121 consecutive symptomatic French patients with a type I protein C deficiency. The French INSERM Network on Molecular Abnormalities Responsible for Protein C and Protein S deficiencies. *Blood* 1995 Oct 1;86(7):2598-605.
100. Kim HJ, Kim DK, et al, Kim SH. Severe protein C deficiency from compound heterozygous mutations in the PROC gene in two Korean adult patients. *Thromb Res* 2008;123(2):412-7.
101. Grinnell BW, Gerlitz B, Berg DT. Identification of a region in protein C involved in thrombomodulin-stimulated activation by thrombin: potential repulsion at anion-binding site I in thrombin. *Biochem J* 1994 Nov 1;303 (Pt 3):929-33.
102. Nakahara M, Koyama T, et al, Hirosawa S. Gradually glycosylated protein C mutants (Arg178Gln and Cys331Arg) are degraded by proteasome after mannose trimming. *Thromb Haemost* 2004 Dec;92(6):1284-90.
103. Soria JM, Morell M, et al, Sala N. Recurrence of the PROC gene mutation R178Q: independent origins in Spanish protein C deficiency patients. *Hum Mutat* 1996;8(1):71-3.
104. Kuusimäki K, Levo A, et al, Partanen J. Genetic background of type I protein C deficiency in Finland. *Thromb Res* 2006;118(5):603-9.
105. Ireland H, Thompson E, Lane DA. Gene mutations in 21 unrelated cases of phenotypic heterozygous protein C deficiency and thrombosis. Protein C Study Group. *Thromb Haemost* 1996 Dec;76(6):867-73.
106. Song KS, Park YS, et al, Park Q. A molecular model of a point mutation (Val297Met) in the serine protease domain of protein C. *Exp Mol Med* 1999 Mar 31;31(1):47-51.

107. Pintao MC, Roshani S, et al, Reisma PH. High levels of protein C are determined by PROCR haplotype 3. *J Thromb Haemost* 2011 May;9(5):969-76.
108. Germain M, Saut N, et al, Morange PE. Genetics of venous thrombosis: insights from a new genome wide association study. *PLoS One* 2011 Sep;6(9):e25581.
109. Buil A, Soria JM, et al, Fontcuberta J. Protein C levels are regulated by a quantitative trait locus on chromosome 16: results from the Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia (GAIT) Project. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004 Jul;24(7):1321-5.
110. Grundy CB, Melissari E, et al, Cooper DN. Late-onset homozygous protein C deficiency. *Lancet* 1991 Aug 31;338(8766):575-6.
111. Koeleman BP, Reitsma PH, Bertina RM. Familial thrombophilia: a complex genetic disorder. *Semin Hematol* 1997 Jul;34(3):256-64.